



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PROBLEMATIKA STANOVENÍ ANTIDEPRESIV

THE ISSUE OF DETERMINING ANTIDEPRESSANTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Michal Kočnar

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1183/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Michal Kočnar**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Problematika stanovení antidepresiv

Zadání bakalářské práce:

1. V teoretické části bakalářské práce charakterizovat vybraná antidepresiva, tj. paroxetin a citalopram.
2. Na základě provedené rešerše zvolit optimální metodiku pro jejich stanovení v odpadních vodách.
3. Metodiku ověřit pomocí pilotní studie a následně na reálných vzorcích odpadních vod.
4. Zhodnotit získané výsledky a interpretovat je.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Michal Kočnar
student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce je zaměřena na problematiku antidepresiv a na stanovení dvou jejich zástupců, paroxetinu a citalopramu, v odpadní vodě odebrané ze tří městských čistíren odpadních vod. V teoretické části této studie jsou obecně charakterizována antidepresiva, dále potom dva zástupci selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu, tj. paroxetin a citalopram. Následně jsou zde prezentovány metody stanovení těchto analytů v odpadních vodách. Experimentální část se zabývá stanovením vybraných látek v reálných vzorcích odpadní vody. Analyty byly z matrice izolovány pomocí extrakce na tuhou fázi a stanoveny pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí v ultrafialové oblasti. Paroxetin byl kvantifikován ve všech vzorcích, citalopram se v některých vzorcích nepodařilo kvantifikovat, v některých ani detekovat.

ABSTRACT

The presented bachelor thesis is focused on the issue of antidepressants and the determination of two of their representatives, paroxetine and citalopram, in sewage taken from three municipal waste water treatment plants. In the theoretical part of this study, antidepressants are generally characterized, more specifically two representatives of selective serotonin reuptake inhibitors, paroxetine and citalopram. Subsequently, the methods of determination of these analytes in waste water are presented. The experimental part deals with determination of selected substances in real samples of waste water. The analytes were isolated from the matrix by solid phase extraction and determined by ultra performance liquid chromatography with ultraviolet spectrophotometric detection. Paroxetine was quantified in all samples, citalopram was not able to quantify, in some samples even to detect.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antidepresiva, paroxetin, citalopram, kapalinová chromatografie, odpadní voda

KEYWORDS

Antidepressant, paroxetine, citalopram, liquid chromatography, waste water

CITACE

KOČNAR, M. *Problematika stanovení antidepressiv*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 53 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval svojí vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Velké díky také patří Ing. Pavlíně Landové za její pomoc s experimentální částí, ale hlavně za obrovskou ochotu a trpělivost. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině, přátelům a kolegům za podporu a pomoc při zpracovávání této práce.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Antidepresiva.....	8
2.1	Historie	8
2.2	Rozdělení antidepresiv.....	10
2.3	Mechanismus účinku	10
2.3.1	Mechanismus účinku thymoleptik	10
2.3.2	Mechanismus účinku thymoeretik	12
2.4	Toxicita a nežádoucí účinky	13
2.4.1	Toxicita antidepresiv.....	13
2.4.2	Nežádoucí účinky antidepresiv	13
2.5	Farmakokinetika	14
2.6	Preskripce antidepresiv	14
3	Inhibitory zpětného vychytávání serotoninu	15
3.1	Paroxetin	15
3.1.1	Názvosloví a chemická struktura	15
3.1.2	Obecná charakteristika a farmakodynamika	16
3.1.3	Farmakokinetika	16
3.2	Citalopram	17
3.2.1	Názvosloví a chemická struktura	17
3.2.2	Obecná charakteristika a farmakodynamika	17
3.2.3	Farmakokinetika	17
4	Metody stanovení antidepresiv ve vodách	19
4.1	Odběr, přeprava a skladování vzorku	19
4.2	Úprava vzorku	19
4.3	Extrakce	20
4.3.1	Extrakce kapalinou.....	20
4.3.2	Extrakce plynem	21
4.3.3	Extrakce pevnou (tuhou) fází.....	22
4.4	Chromatografie	23
4.4.1	Plynová chromatografie	24
4.4.2	Kapalinová chromatografie.....	25
4.4.3	Hmotnostní detekce	27
5	Experimentální část	29
5.1	Použité laboratorní přístroje a vybavení	29
5.2	Použitý software	30

5.3	Použité chemikálie a standardy	30
5.3.1	Chemikálie	30
5.3.2	Standardy	30
5.4	Sledované analyty	30
5.5	Analyzovaná matrice	31
5.6	Optimalizace stanovení analytů	32
5.7	Limity detekce a kvantifikace	32
5.8	Postup stanovení analytů v reálných vzorcích	33
5.8.1	Odběr vzorku	33
5.8.2	Úprava vzorku a extrakce	33
5.8.3	Chromatografická analýza	33
6	Výsledky a diskuze	35
6.1	Optimalizace extrakce	35
6.2	Optimalizace chromatografické analýzy	35
6.2.1	Optimalizace složení mobilní fáze	36
6.2.2	Optimalizace gradientu eluce	36
6.2.3	Optimalizace vlnových délek detekce	37
6.2.4	Výsledná metoda UPLC/DAD	37
6.3	Kalibrace	37
6.4	Limity detekce a kvantifikace	39
6.5	Reálné vzorky odpadní vody	39
6.6	Účinnost odstranění antidepressiv z odpadní vody	40
7	Závěr	43
8	Seznam použitých zdrojů	44
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	48
10	Seznam příloh	50
11	Přílohy	51

1 ÚVOD

Lidskou psychiku lze chápat jako souhrn duševních jevů vzniklých během života jedince; v biologickém pojetí se jedná o projev činnosti nervové soustavy organismu, především centrálního nervového systému. Psychické (duševní) zdraví je důležitým aspektem celkového zdravotního stavu člověka, avšak duševní poruchy ve společnosti jsou v současnosti poměrně častým jevem. Patří mezi ně například schizofrenie, paranoia, halucinace, deprese, ale také agresivita nebo pocity úzkosti a strachu. Lze konstatovat, že v posledních letech dochází k výraznému nárůstu psychických poruch, přičemž v reakci na tuto skutečnost se zvyšuje i preskripce léčiv zvaných psychofarmaka, která se zaměřují na jejich léčbu.

Psychofarmaka jsou obecně látky ovlivňující chemický přenos nervového signálu. Mohou mít různý účinek na duševní funkce; působí na bdělost (vigilitu), afektivitu nebo psychické integrace jedince. Každá z těchto funkcí potom může být ovlivňována buď v pozitivním, nebo negativním smyslu. Antidepresiva patří mezi psychofarmaka ovlivňující afektivitu ve smyslu pozitivním; jednou z poruch afektivity je totiž deprese.

Po užití antidepresiv dochází k jejich absorpci, distribuci, biotransformaci a následně k eliminaci z těla. Antidepresiva vycházejí z organismu především ve formě metabolizované, avšak z části také ve stejné formě, v jaké byly přijaty. K eliminaci dochází zejména prostřednictvím moče a stolice; antidepresiva se tak dostávají do odpadních systémů a jsou transportována na čistírny odpadních vod (ČOV). V procesu čištění vody však nejsou zcela odstraněna, a proto v různých formách pronikají do životního prostředí.

Osud antidepresiv v životním prostředí závisí na jejich vlastnostech, a proto se může u jednotlivých zástupců lišit. Je třeba zohlednit rozpustnost a rozklad ve vodě (solvataci a hydrolýzu), rozklad účinkem světla (fotolýzu) a biodegradaci působením mikroorganismů. Koncentrace antidepresiv ve vodní matrici je rovněž ovlivněna jejich adsorpcí na půdní částice, která se zde projevuje v poměrně velké míře. To sice způsobuje snížení jejich obsahu ve vodě, avšak současně je prodloužena doba jejich setrvání v životním prostředí.

V odpadní i v povrchové vodě jsou antidepresiva obsažena jak v původní nemetabolizované, tak také v metabolizované podobě, a to v nezanedbatelných koncentracích. Sice jsou z těla vylučovány převážně metabolické produkty antidepresiv, které jsou však také v některých případech biologicky aktivní. Terapeuticky využívaná antidepresiva ani jejich metabolity se v životním prostředí přirozeně nevyskytují, a tudíž mohou i v nízkých koncentracích působit negativně zejména na vodní faunu. Ve vyšších koncentracích jsou pro živočichy toxické.

Proto je zapotřebí se zabývat jejich stanovením, a to nejen v biologických tekutinách, ale také ve složkách životního prostředí, především ve vodě.

Cílem této práce je obecně charakterizovat antidepresiva a na základě dostupné literatury vybrat a optimalizovat metodu stanovení dvou jejich zástupců, tj. paroxetinu a citalopramu v odpadní vodě.

Pro stanovení paroxetinu a citalopramu v reálných vzorcích odpadní vody byla použita metoda utráčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí diodovým polem v ultrafialové oblasti, před jejíž aplikací byla provedena extrakce na tuhou fázi.

2 ANTIDEPRESIVA

Antidepressiva představují skupinu léků určených k léčbě **deprese**, což je duševní stav charakterizovaný nadměrným smutkem. Deprese představují jednu z nejčastějších psychických poruch. Dříve se rozlišovaly:

1. Deprese reaktivní (sekundární), které vznikají jako reakce na reálné podněty, stresové události (neštěstí, nemoc, apod.).
2. Deprese endogenní, které jsou následkem biochemické poruchy organismu a navenek se projevují neschopností zvládat běžnou psychickou zátěž.

V současnosti se od tohoto rozdělení upouští, protože příčinou deprese je většinou souhra vnějších i vnitřních (biochemických) faktorů [1, 2].

Deprese mohou probíhat buď jako **unipolární afektivní porucha**, tj. pouze deprese, nebo jako **bipolární afektivní porucha**, tj. deprese střídavě se svým opakem, tzv. mánií (duševní stav charakterizovaný nadměrnou veselostí, rozjařeností a zvýšenou aktivitou). Cyklické střídání depresivních a manických stavů se označuje také jako maniodepresivní (bipolární) psychóza; z hlediska samotné deprese se potom jedná o depresi periodickou [1–3].

Rozsah a kvalita depresivní fáze záleží na jejich příčině; mohou se pohybovat od přemrštěné reakce pochopitelné i zdravým člověkem až po endogenní melancholii, případně smutek tak hluboký, že ho zdravý člověk nedovede pochopit [4]. Obecně lze jako příznaky deprese uvést smutnou náladu, ztrátu zájmů, poruchy spánku, pokles energie, sníženou sebedůvěru, výčitky vůči vlastní osobě nebo poruchy chuti k jídlu v obou směrech [2].

Za příčinu depresí se považuje snížený obsah neurotransmiterů noradrenalinu, serotoninu a dopaminu v oblasti příslušných synapsí. Antidepressiva tento nedostatek potlačují [1, 2]. (Podrobněji je mechanismus účinku antidepressiv popsán v kapitole 2.3.)

Cílem terapie s využitím antidepressiv je zlepšení nálady. Příslušná léčiva se proto používají nejen v psychiatrii, ale také v jiných oborech, kdy depresivní stav pacienta nastal v důsledku jiného onemocnění. Je však sporné, zda je účelné použít antidepressiva i při nepsychotických poruchách. Při reaktivních depresích je třeba vzít v úvahu především kauzální terapii (léčbu příčiny nemoci), zatímco při psychogenních depresivních rozladách může kauzální léčbu představovat právě psychoterapie. Existuje všeobecná zkušenost, že antidepressiva se při nepsychoticky podmíněných rozladách podávají příliš často a bez dostatečného zdůvodnění [4].

2.1 Historie

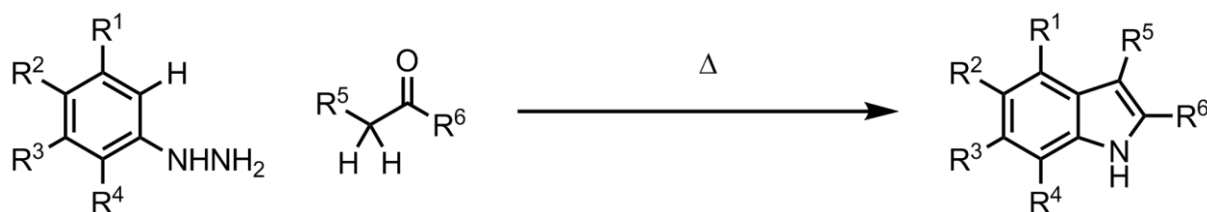
O antidepressivech se začalo hovořit již v 70. letech 19. století. V roce 1874 německý chemik Hermann Emil Fischer náhodně objevil fenylylhydrazin, tj. sloučeninu, která při reakci s aldehydem nebo ketonem poskytuje aromatický heterocyklický indol. Později se stal za tento objev nositelem Nobelovy ceny a tzv. hydrazinové deriváty se dodnes používají při výrobě barviv a farmaceutik [5]. Reakce Fischerovy syntézy indolu je znázorněna na Obr. 1.

Antidepressivních (psychostimulačních) účinků hydrazinových derivátů, konkrétně iproniazidu, si však lékaři všimli až v 50. letech 20. století, a to jako „nežádoucích účinků“ při

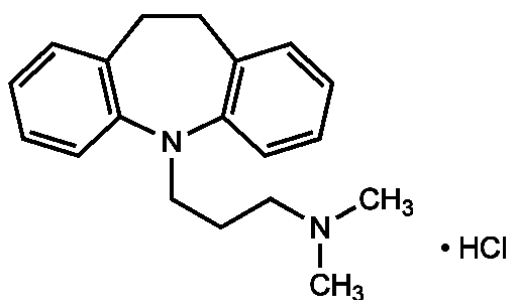
lčbě tuberkulózy. Později byly iproniazid a další deriváty hydrazinu zavedeny v léčbě depresí. K dalšímu rozvoji potom došlo v 60. letech 20. století, kdy byly objeveny antidepresivní účinky imipraminu [1, 5].

Takto byly položeny základy léčby deprese, protože imipramin a iproniazid jsou prototypové látky dvou základních skupin antidepresiv, tj. thymoleptik a thymoeretik. Struktury obou sloučenin jsou znázorněny na Obr. 2 a Obr. 3.

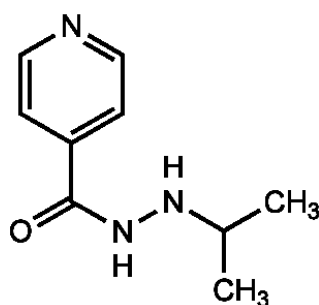
Postupem času byly objasňovány také molekulární mechanismy deprese a působení antidepresiv, k čemuž přispěl v 80. letech 20. století hlavně objev serotoninu [5]. Byly připravovány nové látky a postupně eliminovány jejich nežádoucí účinky. Tak vzniklo několik generací antidepresiv, které známe dodnes.



Obr. 1: Fischerova syntéza indolu [6]



Obr. 2: Imipramin (hydrochlorid) [7]



Obr. 3: Iproniazid [8]

2.2 Rozdělení antidepresiv

Antidepresiva lze rozdělit na dvě základní skupiny podle toho, jakým způsobem zvyšují koncentraci neurotransmiterů, především noradrenalinu a serotoninu, v synaptické oblasti. Jedná se o klasické rozdělení antidepresiv na:

1. **Thymoleptika**, která inhibují zpětný přechod neurotransmiterů ze synaptické štěrby do presynaptického neuronu. V rámci thymoleptik se dále rozlišují:
 - a. **Tricyklická antidepresiva (TCA)** – antidepresiva 1. generace, jejichž prototypem je imipramin. Lze je dále rozdělit na sekundární a terciární aminy [9].
 - b. Antidepresiva 2. generace, z nichž nejvýznamnějším zástupcem je mianserin.
 - c. **Inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI z anglického *selective serotonin reuptake inhibitors*)** – antidepresiva 3. generace. Prototypem této skupiny je fluoxetin; k dalším významným zástupcům je možno zařadit např. citalopram, sertralin a paroxetin.
 - d. Antidepresiva 4. generace (v některé literatuře jsou zařazována pod 3. generaci) – antidepresiva se zdvojeným serotoninovým působením (SARI) a další.
2. **Thymoeretika (IMAO, inhibitory MAO)**, která inhibují monoaminoxidasu (MAO), enzym odbourávající neurotransmitery. Prototypem této skupiny je iproniazid. Thymoeretika lze dále rozlišit podle struktury (hydrazinové, nehydrazinové), podle reverzibility inhibice (reverzibilní, ireverzibilní) a podle selektivity inhibice k jednotlivým typům MAO (MOA-A, MOA-B) [9].
 - a. **Neselektivní IMAO**.
 - b. **Selektivní IMAO**. Významné z nich jsou **reverzibilní inhibitory MOA-A (RIMA z anglického *reversible inhibitors of monoamine oxidase A*)** [1, 9].

2.3 Mechanismus účinku

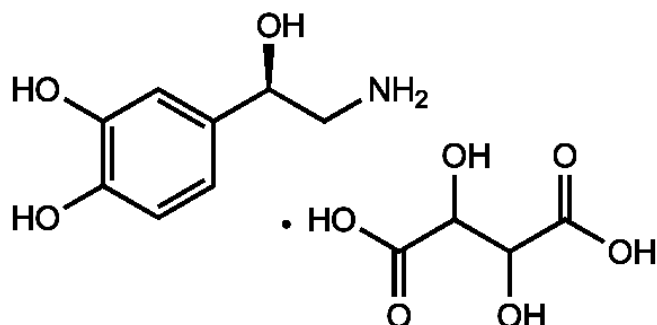
Mechanismus účinku antidepresivního působení antidepresiv není dosud zcela objasněn. Je známo, že všechna antidepresiva ovlivňují metabolismus transmiterů v centrálním nervstvu; konkrétně dochází k ovlivnění koncentrace serotoninu, noradrenalinu a dopaminu v synaptických oblastech. To je však pouze jejich akutní účinek, který závisí na aktuální koncentraci farmaka. Samotné antidepresivní účinky nastupují teprve po dlouhodobější terapii. Toto prodloužení souvisí s pozvolnými adaptačními pochody vznikajícími jako následek chronického zvýšení neurotransmiterů v synapsích. Pravděpodobně dochází k úpravě porušené rovnováhy mezi koncentrací neurotransmiterů a citlivostí receptorů, tj. k jejímu návratu do normy [4].

Podrobnější mechanismus se liší u jednotlivých skupin antidepresiv. Především záleží na tom, jedná-li se o thymoleptikum nebo thymoeretikum.

2.3.1 Mechanismus účinku thymoleptik

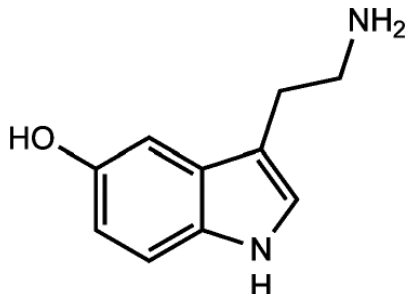
Noradrenalin (norepinefrin) je jedním z neurotransmiterů, jejichž nedostatek je považován za příčinu depresivních nálad. Je syntetizován z aminokyseliny tyrosinu. Při příchodu signálu se vylévá z presynaptického neuronu do synaptické štěrby a obsazuje noradrenergní α_1 , α_2 a β -receptory. Receptory α_2 jsou inhibiční a fungují zde jako negativní zpětná vazba výdeje

neurotransmitteru tak, že stimulují zpětný příjem (*reuptake*) noradrenalinu do synaptického zakončení (presynaptického neuronu), který je zprostředkováván noradrenalinovým transportérem [10]. Struktura noradrenalinu je prezentována na Obr. 4.



Obr. 4: Noradrenalin (hydrotartrát) [11]

Dalším neurotransmiterem je **serotonin** (5-hydroxytryptamin), který je syntetizován z aminokyseliny tryptofanu. Po uvolnění do synaptické štěrbiny obsazuje serotoninergní 5-HT receptory (existuje sedm rodin značených 5-HT₁ až 5-HT₇, z nichž některé mají další podtypy, značené např. 5-HT_{1A}). Ovlivňování těchto receptorů (především 5-HT₁ a 5-HT₂) může způsobovat antidepresivní účinky [12]. Jeho struktura je znázorněna na Obr. 5.



Obr. 5: Serotonin [13]

Mechanismus účinku TCA spočívá v inhibici zpětného vychytávání noradrenalinu a serotoninu (někdy také dopaminu) ze synaptické štěrbiny do presynaptického neuronu. To je způsobeno ovlivněním serotoninergních a noradrenergických receptorů nebo inhibicí serotoninových a noradrenalinových transportérů. Kromě noradrenergických a serotoninergních receptorů ovlivňují TCA i mnoho dalších receptorů (např. muskarinové, histaminové, adrenergní), což vyvolává některé nežádoucí účinky [14].

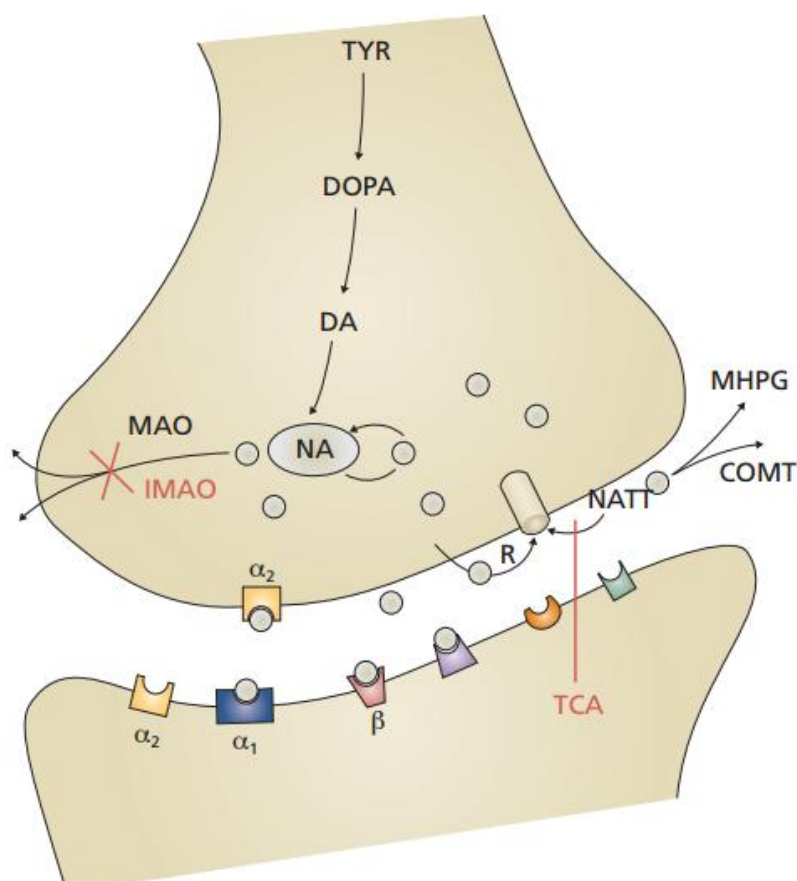
Antidepresiva typu SSRI mají podobný účinek jako TCA, avšak s tím rozdílem, že inhibují selektivně zpětné vychytávání serotoninu (serotoninovými transportéry), a proto zde dochází ke zmírnění nežádoucích účinků.

2.3.2 Mechanismus účinku thymoeretik

Neurotransmitery noradrenalin a serotonin (i dopamin) patří do skupiny tzv. monoaminů, které jsou metabolizovány enzymy **monoaminoxidasami** (MAO). Účinkem thymoeretik dochází k inhibici těchto enzymů, což má za následek zvýšení koncentrace neurotransmiterů v synaptické šterbině.

Existují dva typy MAO – MAO-A a MAO-B. Některá thymoeretika inhibují MAO neselektivně, což však přináší různé nežádoucí účinky. Novější thymoeretika (RIMA) inhibují selektivně MAO-A, které metabolizují primárně serotonin, noradrenalin a dopamin [4].

Obr. 6 znázorňuje mechanismus účinku antidepressiv na koncentraci noradrenalinu v synaptické šterbině. Je zde znázorněna syntéza noradrenalinu (NA), vedoucí přes tyrosin (TYR), dioxyfenylalanin (DOPA) a dopamin (DA), včetně jeho zpětného vychytávání (*reuptake* – R). Také je z tohoto obrázku patrné, že antidepressiva TCA působí na přenos noradrenalinovým transportérem (NATT), zatímco IMAO mají vliv na metabolismus noradrenalinu monoaminoxidasou (MAO).



Obr. 6: Mechanismus účinku antidepressiv [10]

2.4 Toxicita a nežádoucí účinky

V důsledku vlivu na různé druhy receptorů v nervovém systému se u antidepresiv mohou objevovat i při nízkých terapeutických koncentracích nežádoucí vedlejší účinky. Při vyšších dávkách nebo při předávkování jsou však tyto látky toxické a mohou vyvolat různé poruchy organismu, až smrt.

2.4.1 Toxicita antidepresiv

U thymoleptik je známá významná toxicita TCA. K předávkování může dojít i při poměrně malém překročení terapeutické koncentrace, a to z důvodu jejich úzkého terapeutického indexu (rozdílu mezi toxickou a terapeutickou dávkou). Neurotoxicita se projevuje například bolestí hlavy, zmatením, nauzeou nebo zvracením. TCA vykazují také kardiotoxicitu, způsobenou kromě ovlivnění receptorů i blokováním sodných membránových kanálů, čímž je zpomalena depolarizace membrány. Může se objevit sinusová tachykardie, dysrytmie, hypotenze a další příznaky [15, 16]

Méně toxické v porovnání s TCA jsou SSRI, které mají širší terapeutický index. Při velmi vysokých dávkách mohou nastoupit příznaky tzv. serotoninového syndromu, který je způsoben vysokou koncentrací serotoninu v organismu.

Toxicita IMAO se projevuje především při kombinaci s tyraminem obsaženým v jídle (např. v mase, sýrech, čokoládě, alkoholických nápojích), případně s thymoleptiky a dalšími léčivy. Vzhledem k inhibici MAO může dojít k nadměrnému zvýšení koncentrace serotoninu a k nástupu již zmíněného serotoninového syndromu, nebo dokonce až k nebezpečné hypertenzní krizi. IMAO se strukturou založenou na hydrazinu jsou spojovány také s hepatotoxicitou [4, 9].

2.4.2 Nežádoucí účinky antidepresiv

Bylo prokázáno, že nejsilnější nežádoucí účinky mají nejstarší typy thymoleptik, tzv. antidepresiva 1. generace – TCA. Postupným vývojem docházelo k potlačování těchto vedlejších účinků; proto u každé z dalších generací je jejich výskyt nižší. Pacienti, kteří jsou léčeni thymoeretiky, musí dbát zejména na upravenou dietu, protože nežádoucí účinky a toxicita jsou spojeny s konzumací biogenních aminů (viz kapitola 2.4.1).

Profil nežádoucích účinků jednotlivých antidepresiv se odvíjí od postsynaptické receptorové afinity v různých oblastech mozku. V důsledku ovlivnění histaminových receptorů lze pozorovat ospalost nebo zvýšení tělesné hmotnosti. Suchost sliznic, retence moči, rozmazané vidění, případně poruchy paměti, jsou důsledkem vlivu na muskarinové receptory [5].

Samotné noradrenergní působení může vyvolávat například hypotenzi, závratě, reflexní tachykardii nebo poruchy ejakulace. Mezi nežádoucí účinky serotoninergního působení potom zařazujeme zejména nauzeu, zvracení, nespavost, tenze, agitovanost a sexuální dysfunkce. Na počátku léčby SSRI se také může objevit tzv. „*jitteriness syndrome*“, a to jako důsledek počáteční antidepresivní terapie. Vede k pocitu zvýšené vnitřní tenze, nespavosti, bolestem hlavy nebo třesu a vyskytuje se zhruba u 30 % pacientů [5].

2.5 Farmakokinetika

Farmakokinetika se zabývá osudem léčiv v organismu. Předmětem jejího studia je především absorpce, distribuce, metabolismus (biotransformace) léčiva a jeho eliminace z organismu [1].

Antidepresiva vykazují vysokou lipofilitu a po perorálním podání jsou dobře absorbována z gastrointestinálního traktu; mají proto vysokou biodostupnost. Jejich distribuce je ovlivněna vysokou afinitou ke krevním bílkovinám (plasmatickým albuminům), k nimž se TCA a SSRI vážou i z více než 90 % [9].

Metabolismus je různý jak u jednotlivých skupin antidepresiv, tak také v rámci těchto skupin. TCA podléhají v játrech *N*-demethylaci; terciární aminy jsou takto přeměněny na aminy sekundární. Vzniklé metabolity jsou většinou stále biologicky aktivní a mají rovněž antidepresivní účinky. Dalším krokem biotransformace je potom hydroxylace a konjugace s kyselinou glukoronovou. V metabolismu SSRI hraje důležitou roli stereochemie. Například u fluoxetinu jsou sice oba enantiomery biologicky aktivní (v oblasti zpětného vychytávání serotoninu), avšak po *N*-methyloaci však vzniká metabolit norfluoxetin, u něhož je aktivní pouze *S*-enantiomer. Biotransformace IMAO není dosud podrobně prozkoumána, významně se liší u jednotlivých zástupců [9].

Antidepresiva a jejich metabolity jsou z těla vylučovány prostřednictvím moče a stolice. TCA a SSRI mají dlouhý eliminační poločas, řádově i ve dnech; navíc jsou poločasy některých metabolitů výrazně delší. IMAO mají poločasy většinou kratší [9].

2.6 Preskripce antidepresiv

Míra preskripce a spotřeby léčiv se většinou vyjadřuje tzv. **definovanou denní dávkou (DDD)**, což je jednotka představující předpokládanou průměrnou udržovací dávku léčiva na jeden den, podávanou k léčbě při hlavní indikaci pro dospělého člověka [17].

V poslední době došlo k výraznému zvýšení preskripce antidepresiv. Sice mírně klesá míra předepisování TCA a IMAO, zato však rapidně roste spotřeba novějších generací antidepresiv, včetně SSRI [18]. Hodnoty DDD pro jednotlivá léčiva v letech 2003, 2005 a 2008 jsou uvedena v Tab. 1.

Tab. 1: Preskripce antidepresiv [18]

Antidepresiva	DDD		
	2003	2005	2008
Citalopram 20 mg	16,5	27,7	38,5
Sertralin 50 mg	8,2	23,3	32,8
Paroxetin 20 mg	2,7	6,6	8,5
Fluoxetin 20 mg	13,0	9,4	5,7
TCA	10,7	9,0	7,1
IMAO	neuvedeno	2,1	1,7
Celkově	63,4	100,4	134,1

3 INHIBITORY ZPĚTNÉHO VYCHYTÁVÁNÍ SEROTONINU

V současné době jsou nejčastěji předepisovanými antidepresivy SSRI, a to především vzhledem k jejich poměrně malé toxicitě a menšímu výskytu negativních účinků. Navíc díky širokému terapeutickému indexu u nich dochází k předávkování až při vyšších koncentracích, takže nejsou tak nebezpečné v případech pokusů o spáchání sebevraždy (například v porovnání s TCA).

Jsou indikovány zejména u pacientů trpících výraznou úzkostí nebo sebevražednými sklony. Používají se však také při léčbě těžkých obsesních stavů a mentální anorexie [1].

Někteří zástupci SSRI a jejich obchodní názvy jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2: Zástupci SSRI [1]

Antidepresivum	Obchodní názvy
Fluoxetin	Deprex, Prozac, Fluctin
Fluvoxamin	Fevarin, Avoxin
Paroxetin	Paxil, Seroxat, Paroxat
Citalopram	Seropram, Citalec, Citalex, Cipramil
Escitalopram	Cipralex, Lexapro
Sertralin	Zoloft, Loderix

Mechanismem účinku SSRI a zároveň výhodou v porovnání s TCA je selektivní inhibice zpětného vychytávání serotoninu; některé však mají také slabý účinek na zpětné vychytávání noradrenalinu nebo dopaminu, jak ukazuje Tab. 3. „–“ zde značí žádný účinek, „±“ nejistý účinek, „+“ slabý, „++“ mírný, „+++“ středně silný a „++++“ silný účinek na *reuptake* příslušných neurotransmiterů.

Tab. 3: Účinek některých SSRI a jejich metabolitů na inhibici *reuptaku* neurotransmiterů [9]

Antidepresivum	Serotonin	Noradrenalin	Dopamin
Fluoxetin	+++	+	–
Norfluoxetin	+++	+	–
Sertralin	++++	+	±
Desmethysertralin	++	+	–
Paroxetin	++++	++	–
Citalopram	++++	–	–

3.1 Paroxetin

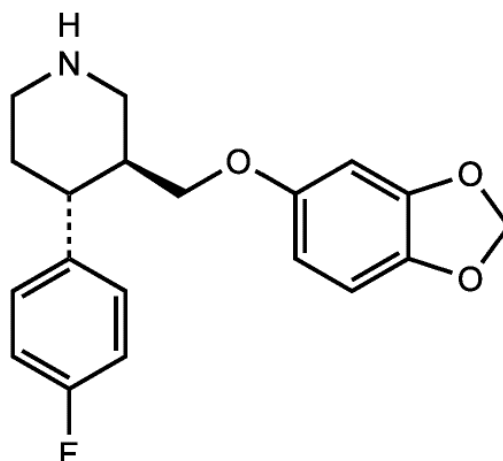
3.1.1 Názvosloví a chemická struktura

Systematický název (podle IUPAC):

(3*S-trans*)-(-)-3-[(1,3-benzodioxol-5-yloxy)methyl]-4-(4-fluorfenyl)piperidin

Obchodní názvy: Paxil, Seroxat, Paroxat a další

Chemická struktura:



Obr. 7: Paroxetin [19]

3.1.2 Obecná charakteristika a farmakodynamika

Paroxetin (PAR), jehož struktura je uvedena na Obr. 7, je jedním ze zástupců SSRI. Jak vyplývá z Tab. 3, má kromě silného účinku na zpětné vychytávání serotoninu také mírný účinek na zpětné vychytávání noradrenalinu. V porovnání s ostatními antidepresivy typu SSRI, zejména s citalopramem, nevykazuje tak vysokou selektivitu k serotoninovým transportérům.

Doporučené dávkování i maximální dávky se liší u jednotlivých indikací, pohybují se od 20 mg po 60 mg denně. Paroxetin by neměl být podáván dětem do 17 let, protože v provedených studiích nebyla potvrzena bezpečnost a účinnost. Kontraindikován je v kombinaci s IMAO, thioridazinem a pimozidem [20].

Některé významné vlastnosti paroxetinu jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4: Některé vlastnosti paroxetinu [21]

Sumární vzorec	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃
CAS	61869-08-7
Molární hmotnost <i>M</i> (g/mol)	329,365
log <i>P</i> (kde <i>P</i> je rozdělovací koeficient v systému oktanol-voda)	3,6
p <i>K</i> _a (kde <i>K</i> _a je disociační konstanta)	9,77

3.1.3 Farmakokinetika

Paroxetin se po perorálním podání dobře vstřebává, z 95 % se váže na plasmatické proteiny. Metabolizuje se na neúčinné produkty (methylace a oxidace). Paroxetin se vylučuje převážně ve formě metabolitů, pouze 2 % nemetabolizovaného paroxetinu se vyloučí močí a méně než 1 % stolicí. Eliminační poločas je proměnlivý, v průměru cca 1 den [20].

3.2 Citalopram

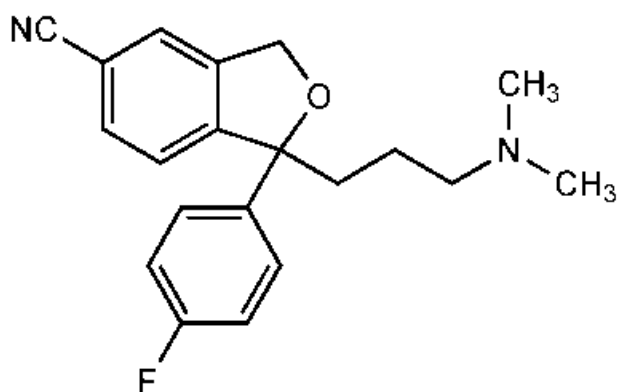
3.2.1 Názvosloví a chemická struktura

Systematický název (podle IUPAC):

1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorfenyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-5-karbonitril

Obchodní názvy: Citalec, Citalex, Celexa, Cipramil, Seropram a další

Chemická struktura:



Obr. 8: Citalopram [22]

3.2.2 Obecná charakteristika a farmakodynamika

Citalopram (CIT), jehož struktura je uvedena na Obr. 8, je jeden ze zástupců skupiny SSRI. Jak vyplývá ze systematického názvu, je směsí enantiomerů, tzn., že tvoří racemickou směs. Na trhu je dostupné také léčivo **escitalopram** (obchodní názvy Cipralex, Lexapro), což je v podstatě izolovaný *S*-enantiomer, který je neúčinnější z izomerů citalopramu.

Dávkování citalopramu je 20 až 40 mg denně. Kontraindikován je v kombinaci s IMAO, linezolidem, přípravky prodlužujícími QT interval a u pacientů s vrozeným nebo získaným dlouhým QT intervalem [23].

Některé významné vlastnosti citalopramu jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Některé vlastnosti citalopramu [24]

Sumární vzorec	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O
CAS	59729-33-8
Molární hmotnost <i>M</i> (g/mol)	324,392
log <i>P</i> (kde <i>P</i> je rozdělovací koeficient v systému oktanol-voda)	3,5
p <i>K</i> _a (kde <i>K</i> _a je disociační konstanta)	9,78

3.2.3 Farmakokinetika

Citalopram se po perorálním podání vstřebává téměř úplně a rovněž nezávisle na příjmu potravy. Společně se svými metabolity se váže na plazmatické bílkoviny (z méně než 80 %). Metabolizuje se na účinný demethylcitalopram, didemethylcitalopram, citalopram-*N*-oxid

a neúčinný deaminovaný derivát propionové kyseliny. Všechny účinné metabolity jsou také SSRI, i když slaběji působící v porovnání s citalopramem.

Citalopram má eliminační poločas cca 1,5 dne. Je vylučován z 85 % játry, ze zbylých 15 % ledvinami. Přibližně 12 až 23 % denní dávky se vyloučí močí jako nezměněný citalopram [23].

4 METODY STANOVENÍ ANTIDEPRESIV VE VODÁCH

Význam terapeutického monitorování (TDM) psychofarmak v poslední době vzrůstá. Roste výskyt psychických poruch, s čímž je spojena i zvyšující se preskripce psychofarmak. Ta se aplikují jak v monoterapii, tak v polyterapii. Z tohoto důvodu je vhodné volit metody umožňující stanovení několika léčiv současně, včetně stanovení jejich farmakologicky aktivních i neaktivních metabolitů [25, 26].

Ke stanovení léčiv v biologických tekutinách (zejména krev, plasma, sérum, moč, mateřské mléko) se používají imunonochemické, elektromigrační a chromatografické metody, které vzhledem ke své mezi detekce umožňují stanovení poměrně nízkých koncentrací léčiv [25]. Pro stanovení léčiv ve vodách (včetně odpadní vody) bylo vyvinuto více postupů, které jsou však většinou založeny na chromatografických metodách [27, 28, 31]. V některých případech se lze setkat i s metodami elektromigračními [32].

Samotnému stanovení analytů v odpadní vodě však předchází odběr vzorku, jeho doprava do laboratoře a následná úprava vzorku. Tyto úkony jsou klíčové pro správný výsledek analýzy. Navíc je třeba dbát na vhodný způsob skladování vzorků.

4.1 Odběr, přeprava a skladování vzorku

Prvním úkonem bývá odběr vzorku, který se má analyzovat. Vzorek musí reprezentovat kvalitu vody v místě, v bodu odběru i v době odběru. **Místo odběru** vyznačuje lokalitu odběru a podrobnější popis (název obce, název ČOV, přítok nebo odtok odpadní vody apod.). **Bod odběru** přesně určuje prostor ve vodním útvaru (proudnice, hloubka apod.). **Množství vzorku** závisí na rozsahu analýzy, je však třeba počítat s rezervou pro případné opakování rozboru (paralelní stanovení, archivní vzorek). Vzorek se odebírá do skleněných, případně plastových lahví, tzv. **vzorkovnic**, a to buď přímo, nebo pomocí speciálních přístrojů a zařízení – **vzorkovačů**.

Odebraný vzorek je většinou nutné dopravit do laboratoře, v níž je následně provedena analýza. Doba, která uplyne mezi odběrem a analýzou, by však měla být co nejkratší, protože většina ukazatelů vody podléhá neustálým změnám. Jde např. o mikrobiologický rozklad organických látek, kterým dochází ke změně složení vody. Pro zmírnění těchto změn lze provést konzervaci vzorku vhodným činidlem, které však nesmí narušit následnou analýzu.

Vzorky se obvykle skladují při teplotách v rozmezí 2 až 5 °C a před analýzou se temperují na požadovanou (laboratorní) teplotu, nikdy však prudkým zahříváním [33].

Způsoby odebírání, konzervování a skladování vzorků vody nejsou jednotně a obecně předepsány, určité pokyny však shrnují české technické normy (ČSN). Konkrétně vzorků odpadní vody se týká ČSN ISO 5667-10.

4.2 Úprava vzorku

Před analýzou je často zapotřebí vzorek nějakým způsobem upravit. K častým úpravám patří filtrace, centrifugace nebo sedimentace za účelem odstranění látek, které by při daných analytických metodách rušily vlastní stanovení analytů. V širším slova smyslu je možné do

úpravy vzorku zahrnout také extrakční metody, prováděné za účelem částečné separace stanovovaných složek ze vzorku (viz kapitolu 4.3) [33].

4.3 Extrakce

Chromatografické metody stanovení organických látek ve vodě nejsou obvykle dostatečně citlivé na to, aby bylo možné analyzovat přímo vzorek odpadní vody na úrovni tak nízkých koncentrací, v jakých se v této matrici tyto látky vyskytují. Je proto nutné nejdříve cílové látky z vody izolovat, s čímž je následně spojeno jejich zakoncentrování. K izolaci se nejčastěji používají metody extrakční. Ty jsou hojně využívány i v případech stanovení antidepresiv ve vodách (a jiných matricích); především jsou preferovány extrakce a mikroextrakce na tuhou fázi (SPE a SPME) [27, 28, 32].

Extrakce je z hlediska fyzikální chemie přechod složky fázovým rozhraním mezi dvěma nemísitelnými kapalinami. V širším pohledu se tak označují i další metody, při nichž složky přecházejí z jedné fáze do druhé, a to i když se principiálně jedná např. o absorpci nebo adsorpci. Podle skupenství použitých fází lze rozlišit různé druhy extrakcí, avšak pro izolaci látek z vod se používají zejména tři z nich:

1. extrakce z kapaliny do kapaliny,
2. extrakce z kapaliny do plynu,
3. extrakci z kapaliny na pevnou (tuhou) fázi [33, 34].

4.3.1 Extrakce kapalinou

Extrakce kapalinou (extrakce z kapaliny do kapaliny, *liquid-liquid extraction* – LLE) je jedním z nejstarších a dosud hojně používaných postupů. Podmínkou procesu je ustanovení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami (výchozím vzorkem vody obsahujícím analyt a organickým rozpouštědlem, do kterého se má analyt převést). V rovnováze potom platí tzv. **Nernstův rozdělovací zákon**, který vyjadřuje rovnice (1), kde K_D je rozdělovací konstanta, c_{org} je rovnovážná látková koncentrace složky v organickém rozpouštědle a c_{aq} je rovnovážná látková koncentrace složky ve vodě.

$$K_D = \frac{c_{\text{org}}}{c_{\text{aq}}} \quad (1)$$

Existují různé možnosti provedení kapalinové extrakce. **Jednostupňová extrakce** je založena na ustavení jediné rovnováhy, zatímco **mnohastupňová extrakce** je opakovaná jednostupňová extrakce v několika oddělených krocích. **Kontinuální extrakce** je založena na ustavení více rovnováh, kdy jednotlivé fáze jsou v trvalém styku a protiproudém pohybu.

Účinnost extrakce E je definována jako poměr hmotnosti látky v organické fázi a hmotnosti látky původně přítomné ve vodné fázi. Vyjadřuje se jako výtěžek extrakce (většinou procentuálně). S využitím rozdělovací konstanty lze účinnost (výtěžek) extrakce vyjádřit rovnicí (2), kde V_{aq} je objem vody a V_{org} je objem organického rozpouštědla.

$$E = \frac{K_D}{K_D + \frac{V_{aq}}{V_{org}}} \quad (2)$$

Z rovnice (2) vyplývá, že nejúčinnější extrakce probíhá při vysoké hodnotě rozdělovací konstanty a při nízkém poměru objemů kapalin (tj. při větším objemu organického rozpouštědla). Hodnota rozdělovacího koeficientu je závislá na rozpustnosti látky v jednotlivých fázích. Čím lépe je látka rozpustná v organické fázi, tím větší hodnotu má její rozdělovací koeficient, a tím účinnější extrakce proběhne. Při malých hodnotách rozdělovacího koeficientu je třeba využít větší objemy organického rozpouštědla, popř. mnohastupňovou extrakci.

Před provedením extrakce z kapaliny do kapaliny je někdy nutné provést úpravu extrahované látky. Např. anorganické ionty je třeba převést do chelátů (komplexních sloučenin), které mají nulový náboj a tím nízkou polaritu a dobrou rozpustnost v organickém rozpouštědle.

Samotná extrakce se provádí uvedením extrahovadla (organického rozpouštědla) do kontaktu s extrahovanou formou (vodou obsahující extrahovanou složku). Přechod složky se urychlí zvýšením mezifázové plochy nejjednodušeji protřepáváním. Potom se za účelem čištění získaného extraktu provádí protřepání s různými dalšími rozpouštědly. Stanovení se následně provede buď přímo v organické fázi, nebo po odpaření a převedení zpět do fáze vodné [33, 34].

4.3.2 Extrakce plynem

Jiným způsobem izolace organických látek z vodní matrice je extrakce plynem. Uvede-li se v uzavřené nádobě plynná fáze s kapalným vzorkem do rovnováhy, pak platí vztah (3), kde $K_{w,G}$ je rovnovážná konstanta, c_w je koncentrace složky ve vodě a c_G je koncentrace složky v plynu.

$$K_{w,G} = \frac{c_w}{c_G} \quad (3)$$

Podle provedení lze rozlišit:

1. **statickou *head space* analýzu**, při které je vzorek uzavřen v nádobě s plynnou fází, přičemž plyn s analytem se z nádoby jímá přes pryžové septum do plynotěsné chromatografické stříkačky;
2. **dynamická *head space* analýza (stripovací metody)**, kdy je vzorek probubláván proudem inertního plynu a následně se plyn vede přes vhodný sorbent, na který se analyty zachytí. Pro následnou analýzu je provedena eluce termicky nebo rozpouštědlem.

Extrakce plynem se používá pro izolaci nepochlívajících těkavých látek z vod [33].

4.3.3 Extrakce pevnou (tuhou) fází

Extrakce na pevnou (tuhou) fázi (*solid phase extraction* – SPE) je v současné době nejvýkonnější a nejčastěji aplikovaná extrakční metoda. Její podstata spočívá v zachycení molekul látek ze vzorku na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Molekuly jsou na sorbentu zachycovány v důsledku působení intermolekulárních interakcí, které závisí na chemické povaze použitých látek.

SPE se provádí pomocí jednorázových **extrakčních kolonek**, které mají rozdílné velikosti a objem a jsou naplněny různými sorbenty. Kapalný vzorek je veden přes SPE kolonku a analyty přítomné ve vzorku jsou zde navázány na sorbent. Sorbenty jsou tvořeny částicemi, které kladou odpor protékající kapalině a jsou v kolonce uzavřeny speciálními fritami z polyethylenu, polytetrafluorethylenu nebo oceli. Průtok kapalin přes kolonku lze urychlit vakuem na výstupu z kolonky, tlakem na vstupu do kolonky nebo centrifugací.

Sorbenty SPE kolonek bývají na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. Modifikace spočívá v tom, že na povrchové silanolové skupiny silikagelu jsou navázány skupiny různého charakteru, které ovlivňují výsledné vlastnosti sorbentu. Lze rozlišit sorbenty:

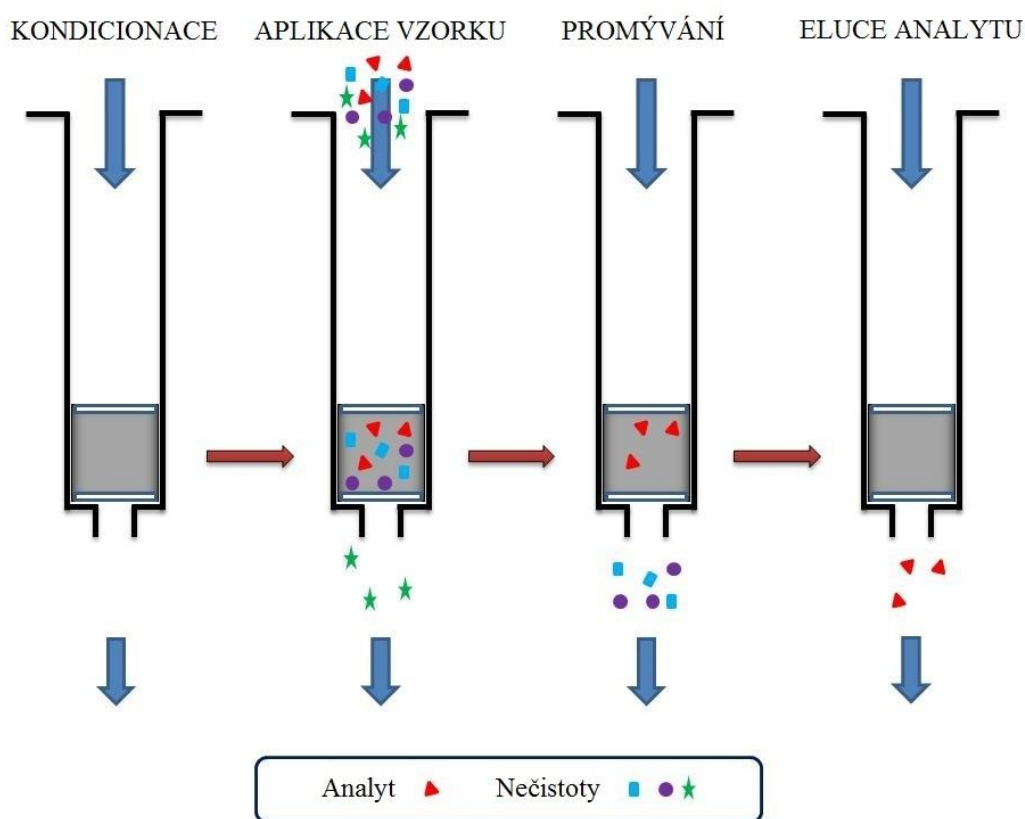
1. Podle obsahu volných silanolových skupin:
 - a. Neuzavřené sorbenty – ne všechny skupiny silikagelu jsou modifikovány, jsou zde obsaženy i volné silanolové skupiny.
 - b. Uzavřené sorbenty – všechny silanolové skupiny silikagelu jsou modifikovány.
2. Podle typu vázané skupiny:
 - a. Nepolární sorbenty – sorbenty vyznačující se hydrofobními vlastnostmi, které lze využít k extrakci nepolárních až středně polárních látek. Použití se podobá chromatografii na reverzních fázích. Např. C18 (oktadecyl), CH (cyklohexyl) apod.
 - b. Polární sorbenty – sorbenty selektivní pro polární sloučeniny. Použití se podobá chromatografii na normálních fázích. Např. Silica (silanol), NH₂ (aminopropyl), CN (kyanopropyl) apod.
 - c. Iontově-výměnné sorbenty – sorbenty selektivní pro disociované látky.

Existují také speciální sorbenty na bázi oxidu hlinitého (aluminy), oxidu hořečnatého nebo oxidu křemičitého.

Provedení SPE probíhá v několika krocích (viz také Obr. 9):

1. **Příprava vzorku před extrakcí.** Cílem je připravit vzorek s optimálními fyzikálními a chemickými vlastnostmi pro účinnou extrakci. V případě extrakce organických látek izolovaných z vody je třeba vzorek přefiltrovat a přizpůsobit pH tak, aby látka byla co nejméně disociovaná a dobře se zachycovala na nepolárním sorbentu.
2. **Solvatace kolonky.** Pro správnou funkci kolonky je třeba provést aktivaci sorbentu vhodným činidlem, např. methanolem, acetonitrilem nebo jiným organickým rozpouštědlem. Solvataci je třeba provádět s pomalým průtokem.
3. **Kondicionace kolonky.** Provede se nasycení kolonky rozpouštědlem podobným matrici. V případě, kdy je matricí odpadní voda, se použije pufrovaná destilovaná voda.

4. **Aplikace vzorku.** Vzorek se nadávkuje na kolonku a nechá se dostatečně dlouho protékat tak, aby se co největší podíl extrahoval. V průběhu kroků solvatace, kondicionace a aplikace vzorku sorbent SPE kolonky nesmí vyschnout.
5. **Promývání kolonky.** Vhodným činidlem jsou z kolonky vymyty zachycené nečistoty přiměřeným průtokem.
6. **Eluce analytu z kolonky.** Analyty jsou ze sorbentu uvolněny vhodným rozpouštědlem opět za pomalejšího průtoku. Může následovat buď hned chromatografická analýza, nebo odpaření kapaliny pod proudem dusíku a následné převedení do rozpouštědla vhodného pro stanovení [34].



Obr. 9: Princip SPE [35]

4.4 Chromatografie

Jak už bylo zmíněno, pro stanovení léčiv ve vodách se téměř výhradně využívají chromatografické metody. Přestože už byly aplikovány i metody plynové chromatografie [31], nejčastěji se lze setkat se stanovením metodami kapalinové chromatografie (HPLC, popř. UPLC) [27, 28].

Chromatografie je separační metoda založená na rozdílech v rovnovážné distribuci látek mezi dvě fáze, fází mobilní a fází stacionární. **Mobilní fáze** unáší vzorek separačním prostorem, **stacionární fáze** představuje náplň separačního prostoru. Složky vzorku jsou v různé míře zadržovány stacionární fází (dochází k **retenci**), čímž se při svém pohybu různou

mírou zbrzdí, a tak dochází k jejich separaci. Výsledkem je postupné dělení složek vzorku za vzniku samostatných zón, které potom postupně vycházejí z kolony (dochází k **eluci**) a následně jsou detekovány na detektoru.

Chromatografické metody lze rozdělit:

1. Podle skupenství mobilní fáze:
 - a. Plynová chromatografie (*gas chromatography* – GC).
 - b. Kapalinová chromatografie (*liquid chromatography* – LC).
 - c. Superkritická fluidní chromatografie (*supercritical fluid chromatography* – SFC)
2. Podle uspořádání stacionární fáze:
 - a. Kolonová chromatografie.
 - b. Plošné techniky – papírová (*paper chromatography* – PC) a tenkovrstvá (*thin layer chromatography* – TLC).
3. Podle principu separace – adsorpční, rozdělovací, iontová a afinitní chromatografie, dále chromatografie na principu síťového efektu (gelová permeační chromatografie) a chromatografie hydrofilních interakcí [34].

Výstupem chromatografie je **chromatogram**, což je v podstatě záznam odezvy detektoru (intenzity signálu) na čas. Na chromatogramu jsou znázorněny chromatografické píky, které charakterizují stanovenou složku, obsaženou v extraktu získaném ze vzorku. Pro identifikaci analytu se používá tzv. retenční čas, pro kvantifikaci potom lze použít buď výšku píku, nebo plochu píku. Retenční čas nám podává informaci o typu analytu; v podstatě je to čas, za který analyt vyjde z kolony, a proto je za daných podmínek charakteristický pro daný analyt, zejména na základě jeho afinity k stacionární a mobilní fázi. Hodnotu retenčního času zjišťovaného analytu získáme tak, že provedeme chromatografickou analýzu standardů sledovaných analytů, a to za stejných chromatografických podmínek.

Aby se docílilo nejúčinnější separace složek, nejprve je třeba provést **optimalizaci metody**. Metodu je třeba nastavit tak, aby hodnota rozlišení byla co největší a zároveň celkový čas analýzy nepřilíš dlouhý. Hodnota rozlišení totiž roste s rostoucí diferencí retenčních časů analytů a s klesající šířkou chromatografických píků, což má kladný vliv při vyhodnocování chromatogramů. Zvýšení hodnoty rozlišení je možné docílit volbou:

- vhodné kolony (délka, stacionární fáze),
- vhodné mobilní fáze (složení kapaliny či plynu),
- vhodných podmínek separace (teplota, průtok mobilní fáze).

4.4.1 Plynová chromatografie

U plynové chromatografie (GC) je mobilní fází inertní plyn, který nemá vliv na separaci analytů. Oddělování složek proto závisí pouze na interakcích se stacionární fází. Metoda GC se provádí vždy v kolonovém uspořádání a je vhodná pro analýzu těkavých látek, které lze snadno převést do plynného stavu.

Zařízení pro GC, **plynový chromatograf**, sestává ze zdroje nosného plynu, čistícího zařízení, regulačního systému, dávkovacího zařízení, koncentrátoru (na počátku kolony), samotné kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Dávkovač, kolona a detektor jsou přitom vyhřívány termostatem, aby byl vzorek udržen v plynném stavu.

Zdrojem nosného plynu je tlaková lahev, odkud je plyn přes redukční ventil hnán do kolony. Čisticí zařízení zachycuje vlhkost a nečistoty z nosného plynu, aby do kolony proudila pouze čistá mobilní fáze. Dávkovacím zařízením se do kolony vpravuje vzorek, a to buď přímo v plynném skupenství (např. plynotěsnou stříkačkou), nebo rozpuštěný v organickém rozpouštědle. Nejprve je jehlou nabrán vzorek a vstříknut na kolonu, kde potom musí v případě kapalného vzorku dojít k co nejrychlejšímu odpaření.

Na počátku kolony může být přítomen koncentrátor, kde se vzorek zachycuje z plynu nebo kapaliny na adsorbent, odkud je termicky desorbován přímo do kolony. Samotná kolona může být buď **náplňová**, což je skleněná nebo ocelová trubice, která je uvnitř naplněna sorbentem sloužícím jako stacionární fáze, nebo **kapilární**, která jako nosiče stacionární fáze používá své vnitřní stěny.

Nosný plyn z kolony protéká detektorem, který reaguje na přítomnost analytu a poskytuje měřitelný signál zaznamenávaný v závislosti na čase. Mezi nejčastěji používané detektory patří:

1. **Tepelně vodivostní detektor** (tzv. katarometr, *thermal conductivity detector* – TCD), jehož princip spočívá v použití vlákna žhaveného konstantním elektrickým proudem, které je v důsledku proudění nosného plynu ochlazováno na určitou teplotu. Přítomnost analytů mění tepelnou vodivost prostředí, tudíž i teplotu vlákna, a tím i jeho elektrický odpor, který je tak možno využít jako detekovaný signál.
2. **Plamenový ionizační detektor** (*flame ionization detector* – FID); zde se molekuly plynu ionizují v plameni, čímž vzniká elektrický proud mezi elektrodami. Přítomnost analytu zvýší ionizaci, a tím i měřený elektrický proud.
3. **Fotoionizační detektor** (*photoionization detector* – PID), u něhož se k ionizaci využívá ultrafialové záření.
4. **Detektor elektronového zachytu** (*electron capture detector* – ECD), kde se k ionizaci používá radioaktivní zářič β .
5. **Hmotnostní detektor** (*mass spectrometer* – MS) [34, 36].

4.4.2 Kapalinová chromatografie

U kapalinové chromatografie (LC) je mobilní fází kapalina, která má vliv na separaci analytů. Oddělování složek tak závisí na interakcích jak se stacionární, tak i s mobilní fází chromatografického systému. Metody LC se provádí buď v kolonovém uspořádání, nebo v plošném uspořádání. Jsou vhodné pro analýzu netěkavých sloučenin, ale i pro tepelně nestálé sloučeniny, protože se pracuje při laboratorní teplotě (nebo jen o málo vyšších teplotách).

Dnes se kapalinová chromatografie v kolonovém uspořádání provádí nejčastěji jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), popřípadě ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC). Jako stacionární fáze se využívají dostatečně malá zrnka sorbentu, která kladou kapalině značný odpor. Pro průtok mobilní fáze se vzorkem je proto nutné pracovat při vyšším tlaku. **Kapalinový chromatograf** pro HPLC (UPLC) se skládá z čerpadla, směšovacího zařízení, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Součástí je i termostat, který má za úkol udržovat stálou teplotu separace.

Čerpadlo pumpuje mobilní fázi (obvykle ze zásobních lahví) na kolonu, přičemž musí být schopno na koloně zajišťovat požadovaný průtok. Směšovací zařízení směšuje jednotlivé složky mobilní fáze. Směšování může být buď konstantní po celou dobu analýzy (**izokratická eluce**), nebo proměnlivé tak, aby bylo dosaženo co nejúčinnější separace (**gradientová eluce**). Dávkovací zařízení vstřikuje vzorek na kolonu. U starších typů chromatografů je zapotřebí nastříknout vzorek manuálně injekční stříkačkou; novější typy jsou opatřeny automatickými injektory.

Kolony jsou u HPLC používány vesměs náplňové. Podle poměru polaritý stacionární a mobilní fáze lze rozlišit dvě základní uspořádání. V systému s **normálními fázemi** (NP-HPLC) je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Častěji se však využívá opačný případ, tj. **systém s obrácenými (reverzními) fázemi** (RP-HPLC), kde je mobilní fáze polárnější než stacionární.

Jiným možným uspořádáním je tzv. **kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí** (*hydrophilic interaction liquid chromatography* – HILIC). Stacionární fází je zde hydrofilní látka, jako mobilní fáze slouží směs vody a organického rozpouštědla. Na povrchu hydrofilní stacionární fáze se tvoří vrstva polární (vodné) složky mobilní fáze, která se pak nazývá stagnantní mobilní fáze či pseudostacionární fáze. Díky tomu vykazují největší afinitu polární látky a nejmenší afinitu látky nepolární.

Z kolony je mobilní fáze vedena přes detektor. Jsou používány různé druhy detektorů:

1. **Spektrofotometrické detektory** (UV-VIS), jejichž princip je založen na absorpci viditelného (VIS) nebo ultrafialového (UV) záření molekulou analytu. Existují různé konstrukční typy:
 - a. detektory pracující při konstantní vlnové délce,
 - b. detektory pracující při několika předem nastavených vlnových délkách,
 - c. detektory s monochromátorem, u nichž lze vlnovou délku nastavovat,
 - d. detektory snímající celé spektrum, opatřené velkým počtem plošných fotodiod, tzv. **diodovým polem** (*photodiode array* – PDA, *diod array detector* – DAD). Každá dioda je spojena s kondenzátorem předem nabitým na určitou hodnotu. Kondenzátor se po dopadu záření vybije, potom je dobíjen a měří se dobíjecí proud.
2. **Fluorimetrické detektory**, které využívají monochromatického záření k excitaci molekul analytů, které potom vydávají emisní záření – měřenou fluorescenci. Výhodou je vyšší citlivost, než např. u UV-VIS detektorů.
3. **Elektrochemické detektory**, které měří elektrický proud vznikající v důsledku elektrochemické oxidace nebo redukce analytů při vloženém napětí mezi pracovní polarizovanou a pomocnou elektrodu. Lze je použít v systémech s reverzními fázemi, kde je vodivá i mobilní fáze.
4. **Vodivostní detektory**, které měří vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami. Mobilní fáze by měla být nevodivá.
5. **Refraktometrické detektory**, jejichž činnost je založena na měření rozdílu indexů lomu čisté mobilní fáze a eluátu.
6. **Hmotnostní detektory** (MS) [34, 36].

HPLC je metodou, která je často využívána ke stanovení antidepresiv i s jejich metabolity. Již byla popsána jako vhodná pro stanovení paroxetinu, sertralinu,

desmethylsertralínu, fluoxetinu, norfluoxetinu, citalopramu, didemethylcitalopramu, demethylcitalopramu a dalších antidepresiv izolovaných z různých maticí [26–30]. Nejčastěji je používána detekce hmotnostními detektory [26–28], ale také spektrofotometrickými DAD [29] a fluorimetrickými [30] detektory.

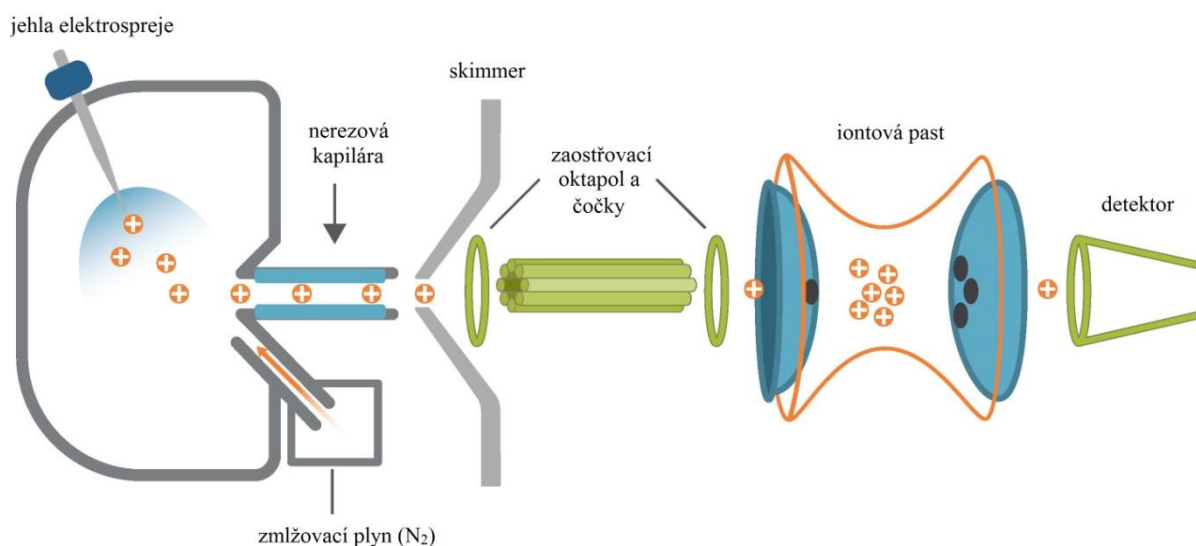
4.4.3 Hmotnostní detekce

U chromatografických metod je výhodné zejména použití hmotnostní detekce, tedy detekce na bázi hmotnostní spektrometrie. Výsledná technika se potom označuje GC/MS, popř. LC/MS (*gas*, popř. *liquid chromatography/mass spectrometry*).

Hmotnostní spektrometrie (*mass spectrometry* – MS) je analytická metoda založená na interakci iontů a polí, konkrétně pole elektrického a magnetického. Ionty jsou ze vzorku vytvářeny ionizací v iontovém zdroji, separovány ve hmotnostním analyzátoru a následně detekovány na detektoru. Separace je založena na rozdílném poměru hmotnosti m a náboje z iontů, tedy poměru m/z .

Ionizace může probíhat různými mechanismy, které se liší podle zvoleného iontového zdroje a volí se především v závislosti na skupenství vzorku. Nejčastější technikou používanou v rámci LC/MS je **ionizace elektrosprejem** (*electrospray ionization* – ESI). Jde o měkkou ionizační techniku, při které je vzorek přiveden do kapiláry a díky vloženému napětí dochází k jeho zmlžování (často se využívá pomocného zmlžování zmlžovacím plynem). Tvoří se malé kapičky zmenšující se až za vzniku samostatných iontů, které jsou přiváděny do hmotnostního analyzátoru.

Mezi hmotnostní analyzátory patří především kvadrupol a iontová past. **Iontová past** (*ion trap* – IT) je složena ze tří elektrod, jedné prstencové a dvou krycích, přičemž do jimi uzavřeného prostoru se připouští helium. Na prstencovou elektrodu se vkládá střídavé radiofrekvenční napětí, které způsobuje pohyb přítomných iontů po stabilních trajektoriích. Molekuly helia iontům odebírají energii, a ty se proto postupně soustřeďují v centrální oblasti pasti. Následně se na elektrody vkládá rostoucí napětí, čímž dojde k separaci iontů podle poměru m/z [47].



Obr. 10: Schéma MS s ESI a IT [37]

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) je založena na fragmentaci dříve separovaného iontu (prekursoru) za vzniku produktových iontů (produktů), které jsou dále analyzovány. Protože způsob fragmentace je pro ion dané látky charakteristický, lze touto technikou poměrně selektivně stanovit ion požadované látky, a tím významně zvýšit poměr signál/šum (S/N).

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité laboratorní přístroje a vybavení

- analytické váhy HR-120-EC, A&D Instruments, Japonsko
- pH metr inoLab[®] 730, WTW Series, WTW, Německo
- ultrazvuková vodní lázeň Teson 4, Tesla, Česká republika
- zařízení pro přípravu Milli-Q vody Milli-Q[®] Academic, Merck Millipore, Německo
- přístroj pro sušení vzorků proudem dusíku EVATERM, LABICOM, Česká republika
- SPE extraktor Baker, model spe – 12G, s vakuovou pumpou, Barmann, Co., USA
- SPE kolonky:
 - Supel[™]-Select HLB (200 mg) SPE Tube, Sigma-Aldrich, Německo
 - Supelclean[™] ENVI-18 (500 mg) SPE Tube, Sigma-Aldrich, Německo
- kapalinový chromatograf Agilent 1 290 Infinity, Agilent, USA
 - binární pumpa
 - automatický dávkovač
 - In-Line Filtr 0,3 μ m
 - kolona ZORBAX Eclipse Plus SB-C18, RRHD, 2,1 \times 100 mm; velikost částic 1,8 μ m, Agilent, USA
 - termostat pro umístění kolon
 - DAD detektor: zdroj záření – deuteriová lampa (rozsah vlnových délek 190–640 nm), diodové pole (1 024 prvků)
- kapalinový chromatograf Agilent 1 100 Series, Agilent, USA
 - kvartérní pumpa
 - automatický dávkovač
 - předkolona Ascentis[®] Express HILIC, 5 \times 2,1 mm; velikost částic 2,7 μ m, Supelco[®] Analytical, Sigma-Aldrich, Německo
 - kolona Ascentis[®] Express HILIC, 150 \times 2,1 mm; velikost částic 2,7 μ m, Supelco[®] Analytical, Sigma-Aldrich, Německo
 - termostat pro umístění kolon
 - DAD detektor: zdroj záření – deuteriová lampa (rozsah vlnových délek 190–640 nm), diodové pole (1 024 prvků)
- hmotnostní spektrometr Agilent 6 320 Ion Trap LC/MS, Agilent, USA
 - ionizace elektrosprejem
 - analýza iontovou pastí
- stříkačkové filtry LUT Syringe Filters PTFE, 13 mm, 0,45 μ m, pk/100, Labicom, Česká republika
- stříkačkové filtry Cronus Syringe Filters Nylon; 4 mm, 0,2 μ m, pk/100, SMI-LabHut, Velká Británie
- kruhové papírové filtry, Filter Papers NM GF 1, průměr 55 mm, Macherey-Nagel, Německo
- běžné laboratorní vybavení

5.2 Použitý software

- ChemStation for LC & LC/MS Systems, ver. 32.1, Agilent, USA
- ChemStation for LC 3D Systems, Agilent, USA
- 6 300 Series TrapControl, ver. 6.2, Bruker Daltonik GmbH, Německo
- Microsoft Office Word 2007, Microsoft, USA
- Microsoft Office Excel 2007, Microsoft, USA
- Paint ver. 6.1, Microsoft, USA

5.3 Použité chemikálie a standardy

5.3.1 Chemikálie

- deionizovaná voda upravená přístrojem Milli-Q[®] Academic firmy Merck Millipore, specifická vodivost $0,055 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ při teplot 24 °C
- acetonitril: Acetonitrile Gradient Grade for HPLC, čistota $\geq 99,9 \%$, Sigma-Aldrich, Německo
- methanol: Methanol HPLC Gradient Grade, čistota $\geq 99,8 \%$, J. T. Baker[®], Nizozemsko
- kyselina chlorovodíková: Kyselina chlorovodíková 35% p. a., PENTA, Česká republika
- amoniak: Amoniak, vodný roztok 25–27% p. a., PENTA, Česká republika
- mravenčí kyselina: Formic acid p. a., čistota $\geq 99,8 \%$, Sigma-Aldrich, Německo
- octan amonný: Ammonium acetate p. a. for HPLC, čistota $\geq 99,0 \%$, Sigma-Aldrich, Německo
- citronová kyselina: Kyselina citronová, monohydrát, čistota $\geq 99,8 \%$ p. a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
- trifluorctová kyselina: Trifluoroacetic acid CHROMASOLV[®] for HPLC, čistota $\geq 99,8 \%$, Sigma-Aldrich, USA
- dusík stlačený, SIAD Czech, spol. s r.o., Česká republika

5.3.2 Standardy

- paroxetin: Paroxetine Hydrochloride 350 mg, USP Reference Standard, United States Pharmacopeia, USA
- citalopram: Citalopram Hydrobromide 200 mg, USP Reference Standard, United States Pharmacopeia, USA

5.4 Sledované analyty

V rámci práce byla jako cílové analyty zvolena dvě antidepressiva, zástupci skupiny SSRI, tj. paroxetin (PAR) a citalopram (CIT). Jedná se o hojně rozšířená a terapeuticky využívaná léčiva, jejichž koncentrace v odpadních vodách bývá často sledována. Při vyšších koncentracích byly pozorovány negativní dopady těchto látek na vodní faunu [38], výsledky analýzy jsou tudíž důležité také z ekotoxikologického hlediska.

5.5 Analyzovaná matrice

Analyzovanou maticí byla odpadní voda z následujících zdrojů:

- Městská čistírna odpadních vod v Brně-Modřicích (ČOV Brno-Modřice), kde byl odebrán směsný vzorek vody na přítoku do čistírny a směsný vzorek vody na odtoku z čistírny, a to denně od 26. 4. 2017 do 30. 4. 2017.
- Městská čistírna odpadních vod z města A (ČOV A), kde byl 3. 5. 2017 odebrán vzorek vody na přítoku do čistírny, vzorek z aktivací nádrže a vzorek na odtoku z čistírny, všechny vzorky prosté.
- Městská čistírna odpadních vod z města B (ČOV B), kde byly odebrány vzorky stejným způsobem jako u ČOV A.

ČOV A i ČOV B jsou reálné městské čistírny odpadních vod, které v této práci nejsou plně specifikovány na základě požadavku jejich vedení. ČOV A je čistírna na hranici látkového zatížení, kde je z důvodu malého objemu aktivací nádrže kratší kontakt s aktivovaným kalem. ČOV B není látkově ani hydraulicky plně zatížena, kontakt s aktivovaným kalem je zde delší. Na ČOV A připadá 18 000 ekvivalentních obyvatel, na ČOV B 19 000 ekvivalentních obyvatel.

Odpadní voda byla u všech čistíren odebírána vždy jak na přítoku, tak i na odtoku, aby mohla být posouzena účinnost odbourávání antidepresiv v procesu čištění vody.

Na Obr. 11 je fotografie leteckého pohledu na ČOV Brno-Modřice.



Obr. 11: Letecký pohled na ČOV Brno-Modřice

5.6 Optimalizace stanovení analytů

Nejprve byla provedena optimalizace chromatografické metody (UPLC/DAD). Pro její potřeby byl připraven roztok standardů paroxetinu a citalopramu o koncentraci $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v acetonitrilu; pH testovaných pufrů bylo měřeno pH elektrodou a případně upravováno roztokem zředěné kyseliny chlorovodíkové.

Následně byly připraveny kalibrační roztoky standardů o koncentracích 2; 3; 4; 5; 6; 7 a $8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a optimalizovanou metodou UPLC/DAD byla naměřena kalibrační křivka.

Optimalizace extrakční metody (SPE) byla provedena za použití standardů analytů a vyhodnocena s využitím naměřené kalibrační křivky; pH Milli-Q vody bylo upravováno zředěným roztokem amoniaku. Výtěžnost analytů (v procentech) byla určena jako podíl koncentrace analytu po provedení SPE ku koncentraci původní.

Protože citalopram je ve standardu obsažen ve formě hydrobromidu a paroxetin ve formě hemihydrátu hydrochloridu, bylo nutné koncentrace kalibračních roztoků a hmotnosti použité pro optimalizaci SPE přepočítat podle koeficientů uvedených výrobcem tak, aby výsledky odpovídaly množství čistých látek. Tyto koeficienty jsou uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6: Hodnoty pro přepočet standardu na čistou složku

	CIT	PAR
Forma látky ve standardu	Hydrobromid	Hemihydrát hydrochloridu
Hmotnost látky připadající na 1 mg standardu [mg]	0,997	0,975

Všechny roztoky určené ke chromatografické analýze byly vždy přefiltrovány přes stříkačkové filtry a skladovány v chladu ve tmavých vialkách.

5.7 Limity detekce a kvantifikace

Limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ) byly určeny postupem podle literatury [39]. Nejprve byla z nejnižšího bodu kalibrace, tj. při koncentraci c , odečtena výška signálu daného analytu, označená jako signál S . Potom bylo při téže koncentraci ze šumu základní linie náhodně zvoleno patnáct píků generovaných jako šum a byla vypočtena průměrná hodnota N . Hodnoty LOD a LOQ byly získány dle vztahů (4) a (5) a následně přepočteny s ohledem na výtěžnost SPE a použitý objem vzorku.

$$LOD = 3 \cdot \frac{c}{S : N} \quad (4)$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{c}{S : N} \quad (5)$$

5.8 Postup stanovení analytů v reálných vzorcích

5.8.1 Odběr vzorku

Odpadní voda byla v čistírnách odebírána kvalifikovanými pracovníky do tmavých skleněných vzorkovnic o objemu 1 l. Vzorky byly po transportu do začátku analýzy skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

5.8.2 Úprava vzorku a extrakce

Všechny vzorky byly nejprve přefiltrovány přes klasický celulosový filtr na Büchnerově nálevce, poté přes speciální filtr ze skelných vláken za použití vodní vývěvy. Následně bylo upraveno pH vzorků na hodnotu 7,5 pomocí roztoku zředěné kyseliny chlorovodíkové, příp. 0,1M roztoku amoniaku.

Byla provedena extrakce na tuhou fázi pomocí SPE extraktoru Baker za podmínek uvedených v Tab. 7. Pro potřeby SPE byla připravena Milli-Q voda s pH upraveným na hodnotu 7,5 za použití zředěného roztoku amoniaku, příp. roztoku zředěné kyseliny chlorovodíkové. Po eluci byl vzorek vysušen pod proudem dusíku, následně rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu a přefiltrován přes stříkačkové filtry do vialek pro chromatografickou analýzu.

Tab. 7: Podmínky SPE

SPE kolonka	Supel™-Select HLB (200 mg) SPE Tube
Solvatace, kondicionace	4 ml methanolu; 4 ml Milli-Q vody o pH = 7,5
Aplikace vzorku	200 ml přefiltrované odpadní vody o pH = 7,5
Promývání	3 ml Milli-Q vody o pH = 7,5
Eluce	2× 3 ml acetonitrilu

5.8.3 Chromatografická analýza

Analýza vzorku byla provedena na kapalinovém chromatografu (UPLC) Agilent 1 290 Infinity se spektrofotometrickou (DAD) detekcí. K identifikaci i kvantifikaci analytů byla použita naměřená kalibrační křivka. Podmínky analýzy jsou uvedeny v Tab. 8 a Tab. 9. Na Obr. 12 je fotografie přístroje Agilent 1 290 Infinity včetně DAD detektoru.

Tab. 8: Podmínky separace a detekce

Nástřik	1 µl
Kolona, stacionární fáze	ZORBAX Eclipse Plus SB-C18, RRHD, 2,1 × 100 mm; velikost částic 1,8 µm
Teplota kolony	30 °C
Mobilní fáze	methanol (MeOH); 0,1% trifluoroctová kyselina (TFA)
Průtok mobilní fáze	0,3 ml/min
Eluce	gradientová (viz Tab. 9)
DAD detekce	CIT: $\lambda_{\max} = 238 \text{ nm}$; PAR: $\lambda_{\max} = 293 \text{ nm}$

Tab. 9: Gradient mobilní fáze

t [min]	0	5,3	6	9	11
x_{TFA} [obj. %]	10	90	100	100	10
x_{MeOH} [obj. %]	90	10	0	0	90

Tab. 10: Retenční časy analytů

	CIT	PAR
t_{R} [min]	4,877	5,272



Obr. 12: Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Optimalizace extrakce

Pro nalezení optimální metody extrakce analytů byly testovány dva druhy SPE kolonek. SPE metoda byla prováděna se standardy, konkrétně bylo vždy použito 8 µg hydrobromidu citalopramu a 8 µg hemihydrátu hydrochloridu paroxetinu. Uvedené hmotnosti byly přepočteny na obsah čistých analytů podle koeficientů uvedených výrobcem. Podmínky a výsledky optimalizace jsou shrnuty v Tab. 11.

Tab. 11: Optimalizace SPE

SPE kolonka	Supelclean™ ENVI-18 (500 mg) SPE Tube	Supel™-Select HLB (200 mg) SPE Tube	
Solvatace, kondicionace	2 ml methanolu; 2 ml Milli-Q vody o pH = 7	4 ml methanolu; 4 ml Milli-Q vody o pH = 7	4 ml methanolu; 4 ml Milli-Q vody o pH = 7,5
Aplikace vzorku	7,976 µg CIT; 7,8 µg PAR; 200 ml Milli-Q vody		7,976 µg CIT; 7,8 µg PAR; 200 ml Milli-Q vody o pH = 7,5
Promývání	–		3 ml Milli-Q vody o pH = 7,5
Eluce	2× 2 ml acetonitrilu		2× 3 ml acetonitrilu
Výtěžnost CIT	koncentrace < LOD	87,19 %	100,40 %
Výtěžnost PAR	koncentrace < LOD	36,15 %	81,28 %

Je zřejmé, že SPE kolonka Supelclean™ ENVI-18 téměř nezadržuje ani jeden z analytů. Naopak při použití kolonky Supel™-Select HLB je výtěžnost analytů po optimalizaci zcela uspokojivá. Vyšší koncentrace analytů ve výsledném roztoku po provedení SPE byly naměřeny při používání Milli-Q vody s pH upraveným na hodnotu 7,5 a elucí větším objemem acetonitrilu. Příčinou byla pravděpodobně vyšší hodnota pK_a obou látek (pohybuje se okolo 9,8); látky jsou tak při vyšším pH ve vodě méně rozpustné a lépe se adsorbují na SPE kolonkách. Svoji roli na vyšší výtěžnosti zde samozřejmě také hraje větší objem elučního činidla.

6.2 Optimalizace chromatografické analýzy

Před provedením chromatografické analýzy reálných vzorků byla provedena optimalizace podmínek separace; konkrétně bylo optimalizováno složení mobilní fáze a gradient eluce. Rovněž byly vybrány vlnové délky vhodné pro spektrofotometrickou detekci.

6.2.1 Optimalizace složení mobilní fáze

Jako organická složka mobilní fáze byl nejprve vybrán acetonitril, pro který byly následně ověřovány různé polární složky. Vzhledem k vlastnostem sledovaných analytů bylo zapotřebí zvolit pufr o nižším pH; testovány byly následující pufrы (pH bylo v některých případech upraveno zředěnou kyselinou chlorovodíkovou):

- octan amonný (0,01 M; pH = 4,5)
- mravenčí kyselina (0,01 M; pH = 2,9)
- citronová kyselina (0,01 M; pH = 2,4)
- trifluoroctová kyselina (0,1 %; pH = 2,0)

Octan amonný a mravenčí kyselina neposkytovaly při izokratické eluci vhodné podmínky pro následnou separaci, a to prakticky v žádném poměru s acetonitrilem. Bylo proto nutné provádět analýzu gradientovou elucí. Avšak ani při různých nastaveních gradientu, a to za použití zmíněných dvou pufrů, nevykazovaly analyty přijatelnou separaci na koloně. Tvar píků se sice znatelně zlepšil, avšak retenční časy analytů nebyly optimální a také píky nebyly symetrické, protože docházelo ke chvostování.

Výrazného zlepšení bylo dosaženo až při testování citronové kyseliny. Při vhodném nastavení gradientu byly získány již více symetrické píky, pravděpodobně díky nižšímu pH. Citronová kyselina však může mít korozivní účinky na kolonu, rovněž příprava roztoku není zcela jednoduchá a v případě aplikace metody s hmotnostní detekcí by použití tohoto pufru nebylo vhodné.

Proto byl jako pufr zvolen 0,1% roztok trifluoroctové kyseliny, jehož pH se pohybuje v podobné oblasti jako pH použitého roztoku kyseliny citronové. Při použití trifluoroctové kyseliny již byla symetrie píků dostatečná, problém však stále spočíval v příliš nízkých retenčních časech. Při některých nastaveních gradientu se sice zvýšily retenční časy, ale vždy se podstatně zhoršila symetrie.

Tento problém byl nakonec vyřešen změnou organické složky mobilní fáze. Acetonitril byl vyměněn za methanol, který má menší eluční sílu, a analyty jsou proto na koloně zadržovány delší dobu.

Výsledkem optimalizace složení mobilní fáze je tudíž systém 0,1% trifluoroctové kyseliny s methanolem, při jehož použití dochází (při vhodném gradientu eluce) k nejúčinnější separaci paroxetinu a citalopramu na zvolené koloně.

6.2.2 Optimalizace gradientu eluce

Gradient eluce byl pro popsání systém volen tak, aby v průběhu analýzy docházelo ke zvyšování eluční síly a konečný stav gradientu aby se rovnal stavu počátečnímu. U RP-HPLC platí, že eluční síla roste s klesající polaritou mobilní fáze, takže methanol má větší eluční sílu než trifluoroctová kyselina. Proto byl zpočátku nastaven objemový zlomek methanolu na nižší hodnotu, s časem stoupal a na závěr analýzy byl vrácen na původní hodnotu.

Byla testována různá rychlost stoupání objemového zlomku methanolu, od 5 do 15 obj. % za minutu. Nejúčinnější separace probíhala při nejrychlejší stoupání podílu methanolu v mobilní fázi.

Výsledkem optimalizace je gradient eluce uvedený v Tab. 9.

6.2.3 Optimalizace vlnových délek detekce

Z absorpčních spekter stanovovaných látek byla vybrána absorpční maxima, tj. vlnové délky s maximální absorbancí. Tyto vlnové délky byly zvoleny pro detekci, protože při nich analyty poskytují nejvyšší odezvu na detektoru. Absorpční maxima λ_{\max} jsou pro obě stanovované látky uvedeny v Tab. 8, naměřená absorpční spektra jsou přiložena jako Příloha 1.

Z uvedených absorpčních spekter je zřejmé, že paroxetin s absorpčním maximem při 293 nm absorbuje UV záření i při 238 nm. Proto se jeho pík vyskytuje v naměřených chromatogramech při obou vlnových délkách. Naproti tomu citalopram při 293 nm UV záření neabsorbuje, a příslušný pík je proto jen v chromatogramu pro jeho absorpční maximum 238 nm. Absorpce paroxetinu při 238 nm je patrná také u reálných vzorků, avšak vyhodnocení bylo prováděno vždy z chromatogramů pro absorpční maximum daného analytu.

6.2.4 Výsledná metoda UPLC/DAD

Podmínky separace výsledné optimalizované metody jsou uvedeny v Tab. 8 a Tab. 9, chromatogramy standardů naměřené touto metodou jsou přiloženy jako Příloha 2.

Celá chromatografická analýza jednoho vzorku provedená výslednou metodou trvá 11 minut, před započítáním další analýzy je nutné vyčkat minimálně 3 minuty pro vyrovnění tlaku na koloně. Retenční časy analytů se pohybují kolem 5 minut, přesné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 10. Při proměření standardu tvoří plocha píku citalopramu 80 %, plocha píku paroxetinu 20 %, a to z celkové odezvy analytů. Míra symetrie píků se pohybuje kolem hodnoty 0,9.

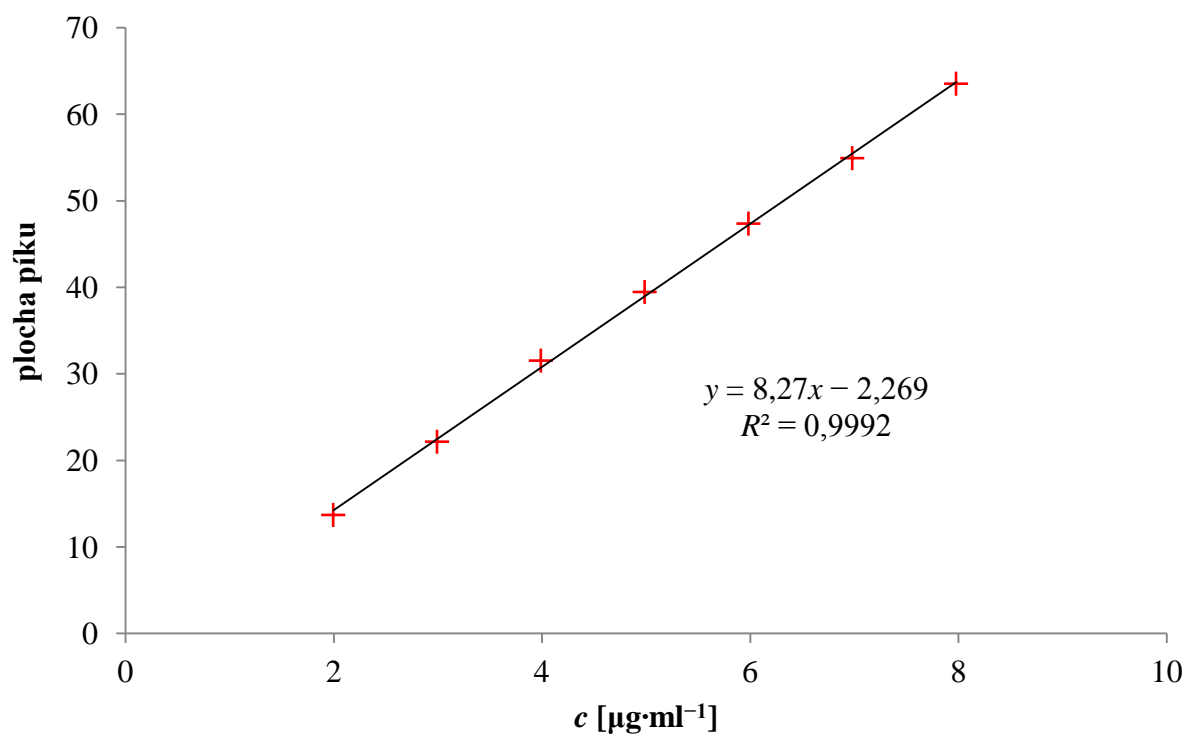
6.3 Kalibrace

Optimalizovanou metodou UPLC/DAD byla naměřena kalibrační křivka. Kalibrační roztoky byly připraveny ze standardů v rozmezí koncentrací od 2 do 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, s krokem 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tyto hodnoty však představují koncentrace standardů, tj. hydrobromidu citalopramu a hemihydrátu hydrochloridu paroxetinu. Uvedené koncentrace byly proto přepočteny tak, aby metodou stanovené koncentrace odpovídaly čistým látkám; výsledky viz v Tab. 12.

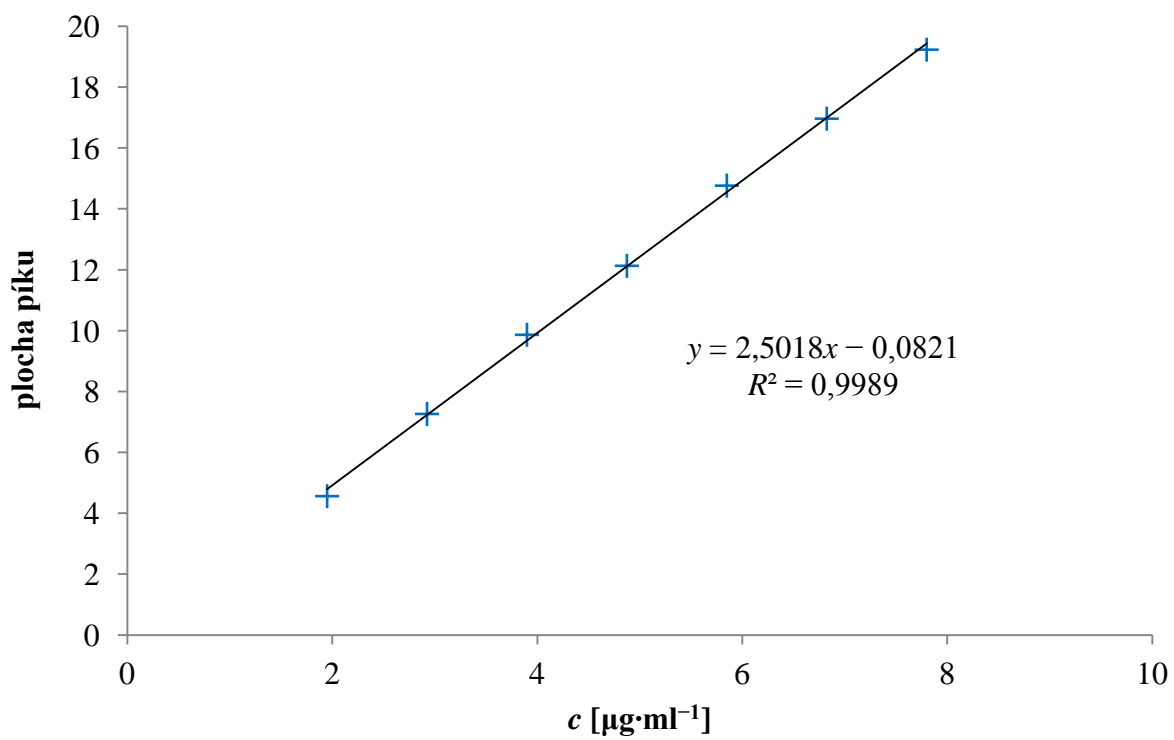
Kalibrační křivky analytů jsou znázorněny na Obr. 13 a Obr. 14, jejichž součástí jsou také příslušné rovnice lineární regrese a koeficienty spolehlivosti. Obě kalibrační závislosti jsou ve zvoleném koncentračním rozmezí lineární.

Tab. 12: Koncentrace přepočtené na čisté látky

$c [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$	$c(\text{CIT}) [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$	$c(\text{PAR}) [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$
2	1,994	1,950
3	2,991	2,925
4	3,988	3,900
5	4,985	4,875
6	5,982	5,850
7	6,979	6,825
8	7,976	7,800



Obr. 13: Kalibrační křivka citalopramu



Obr. 14: Kalibrační křivka paroxetinu

6.4 Limity detekce a kvantifikace

Limity detekce a kvantifikace sledovaných analytů byly stanoveny postupem uvedeným v kapitole 5.7. Hodnoty získané podle rovnic (4) a (5) byly přepočteny s ohledem na příslušné výtěžnosti SPE a použitý objem 200 ml vzorku. Výsledky uvedené v Tab. 13 proto představují detekční a kvantifikační limity koncentrace analytů v původní matrici.

Tab. 13: LOD a LOQ analytů

	CIT	PAR
LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	5,35	4,74
LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	17,84	15,79

LOD a LOQ mají pro citalopram vyšší hodnoty, protože při jeho detekci byl naměřen vyšší šum pozadí. To může být způsobeno nízkou detekční vlnovou délkou, při které dochází k absorpci UV záření u více druhů molekul. Vysoký šum pozadí lze tak přičíst obsahu absorbujících nečistot.

6.5 Reálné vzorky odpadní vody

Byla provedena analýza reálných vzorků odpadní vody, odebrané ze tří ČOV uvedených v kapitole 5.5, a to postupem prezentovaným v kapitole 5.8. Celý postup stanovení byl proveden vždy dvakrát paralelně a získané koncentrace byly zprůměrovány. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 14 a Tab. 15, kde c_s je koncentrace analytu na přítoku, c_A koncentrace v aktivační nádrži (pokud odtud byl odebrán vzorek) a c_O koncentrace na odtoku z ČOV.

Tab. 14: Koncentrace analytů v odpadní vodě z ČOV Brno-Modřice

Den	Datum	CIT		PAR	
		c_s [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	c_O [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	c_s [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	c_O [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
Středa	26. 4. 2017	< LOD	< LOQ	23,81	22,95
Čtvrtek	27. 4. 2017	< LOD	< LOQ	16,43	21,10
Pátek	28. 4. 2017	< LOD	< LOQ	26,27	18,89
Sobota	29. 4. 2017	< LOD	< LOQ	26,14	19,87
Neděle	30. 4. 2017	< LOD	< LOQ	31,68	20,98

Tab. 15: Koncentrace analytů v odpadní vodě z ČOV A a ČOV B

ČOV	CIT			PAR		
	c_s [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	c_A [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	c_O [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	c_s [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	c_A [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]	c_O [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
ČOV A	< LOQ	< LOQ	< LOD	20,63	21,52	23,91
ČOV B	< LOQ	< LOQ	< LOD	23,41	19,12	20,76

Na podkladě získaných výsledků analýzy obsahovaly všechny vzorky odpadní vody ze dvou stanovovaných analytů převážně paroxetin, který se zde vyskytoval v koncentracích přibližně dvakrát až třikrát větších než citalopram. Vzhledem k vysokým hodnotám LOD

a LOQ však nebylo možné citalopram přesně kvantifikovat, v některých případech dokonce vůbec detekovat.

Látky byly obsaženy v odpadní vodě odebrané z ČOV Brno-Modřice i z ČOV A a B na podobné koncentrační úrovni, přestože města A a B mají v porovnání s Brnem menší počet ekvivalentních obyvatel. Největší koncentrace analytů ve vodě z ČOV Brno-Modřice byly naměřeny ve vzorcích odebraných ve středu 26. 4. 2017 a v neděli 30. 4. 2017.

Vyšší stanovené koncentrace paroxetinu, alespoň v porovnání citalopramem, se zdají být v rozporu s tvrzením, že citalopram je oproti paroxetinu mnohem více předepisovaným léčivem. V již publikované studii [18] byla DDD citalopramu ve všech sledovaných letech vždy mnohonásobně větší než DDD paroxetinu (viz Tab. 1). Navíc z farmakokinetického hlediska se paroxetin po podání pacientovi z organismu eliminuje nemetabolizovaný pouze asi z 2 %, zatímco citalopram až z 23 % [20, 23].

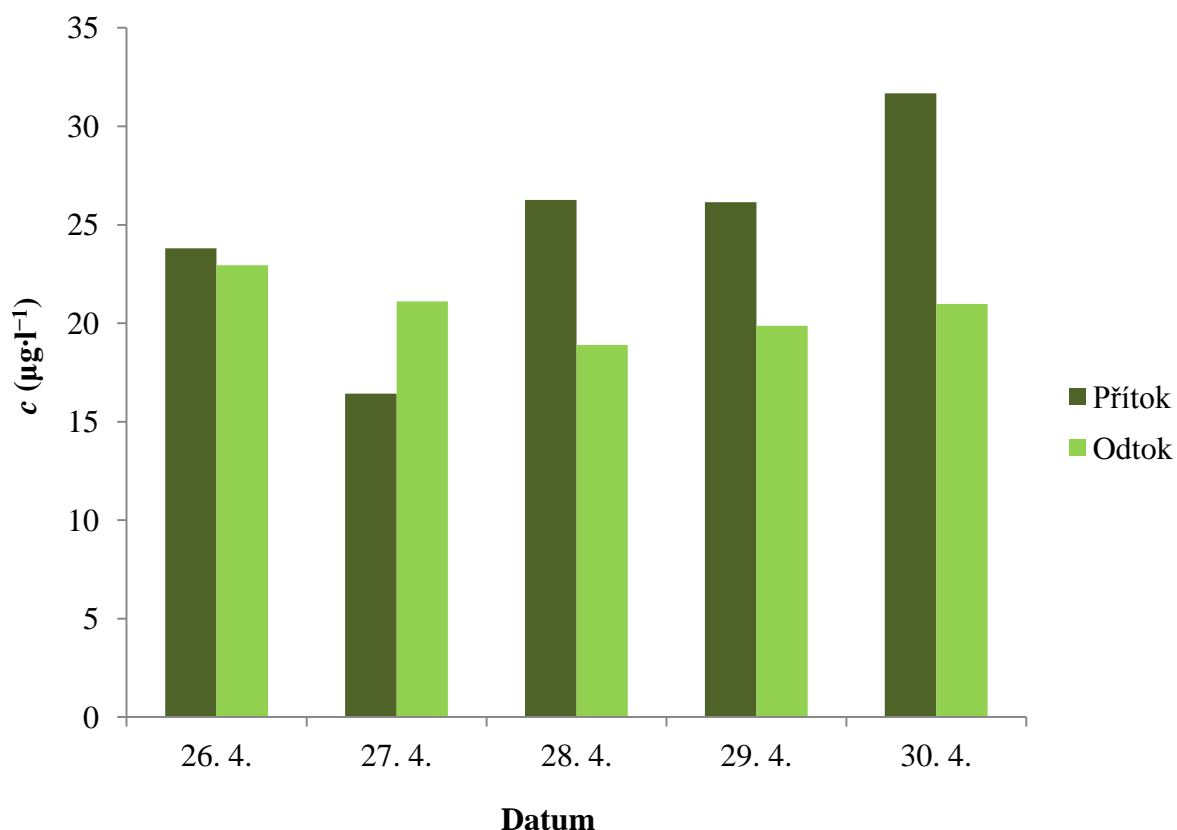
Po eliminaci z těla jsou látky na ČOV dopravovány odpadní vodou, a proto je pro posouzení jejich výsledné koncentrace nutné zohlednit jejich chování ve vodním prostředí. Obě látky mají podobné hodnoty $\log P$ (pohybující se kolem 3,5), jsou poměrně dobře rozpustné ve vodě a stabilní vůči hydrolýze. Biodegradace působením mikroorganismů je u nich zanedbatelná. Velký rozdíl je v poločasech rozpadu fotolýzou, kdy citalopram s poločasem 39 dní je na světle mnohem stabilnější než paroxetin, jehož poločas je pouhých 0,67 dne. I kdyby se však fotolýza projevila ve znatelné míře, opět by to odporovalo naměřené vyšší koncentraci paroxetinu. Jedním z možných vysvětlení tohoto výsledku je větší schopnost citalopramu adsorbovat se na půdní částice. Rozdělovací koeficient v systému půdní organický uhlík a voda, značený K_{oc} , je totiž vyšší pro citalopram ($\log K_{oc} = 5,63$) než pro paroxetin ($\log K_{oc} = 4,47$). Hodnoty se však podle našeho názoru neliší tolik, aby mohly v takovém rozsahu ovlivnit výsledky analýzy. Navíc i při všech zmíněných faktorech je frekvence detekce citalopramu v prováděných analýzách většinou přibližně 25× větší než detekce paroxetinu [38].

Opačný poměr stanovených koncentrací analytů lze vysvětlit buď matričním efektem projevujícím se u zvolené metody, případně jiným vnějším faktorem. Matriční efekt odpadní vody na měřené koncentrace analytů může být velký, vliv na vlastní stanovení má také poměrně vysoký šum při analýze všech vzorků.

Příklady chromatogramů reálných vzorků jsou přiloženy jako Příloha 3.

6.6 Účinnost odstranění antidepresiv z odpadní vody

Na základě výsledků analýzy byla posouzena účinnost odstranění antidepresiv v procesu čištění odpadní vody ve třech sledovaných ČOV. Protože koncentrace citalopramu byly pod LOQ, příp. i pod LOD, mohla být posouzena pouze účinnost odstranění paroxetinu. Výsledky jsou prezentovány v grafech na Obr. 15 a Obr. 16 a v Tab. 16 a Tab. 17.

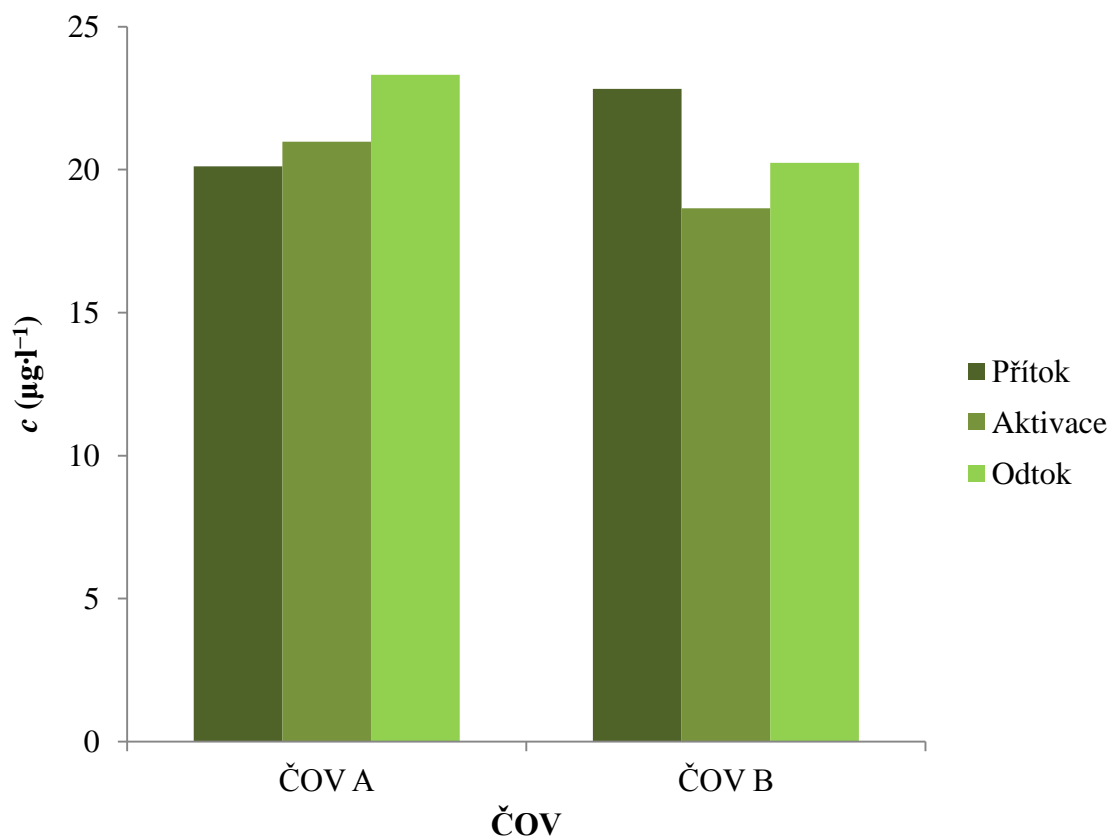


Obr. 15: Koncentrace paroxetinu ve sledované dny v ČOV Brno-Modřice

Tab. 16: Účinnost odstranění paroxetinu při čištění vody v ČOV Brno-Modřice

Den	Datum	$c_s [\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	$c_o [\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	Účinnost [%]
Středa	26. 4. 2017	23,81	22,95	3,61
Čtvrtek	27. 4. 2017	16,43	21,10	-28,43
Pátek	28. 4. 2017	26,27	18,89	28,08
Sobota	29. 4. 2017	26,14	19,87	23,98
Neděle	30. 4. 2017	31,68	20,98	33,77

Z grafu na Obr. 15 a z dat uvedených v Tab. 16 je zřejmé, že kromě úterních vzorků dochází v procesu čištění odpadní vody k poklesu koncentrace paroxetinu. Pominou-li se kromě vzorků úterních také vzorky pondělní, účinnost odstranění paroxetinu se v průměru pohybuje kolem 30 %, což znamená, že čtvrtina až třetina analytu je z vodního systému eliminována.



Obr. 16: Koncentrace paroxetinu v ČOV A a ČOV B

Tab. 17: Účinnost odstranění paroxetinu při čištění vody v ČOV A a ČOV B

	$c_s [\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	$c_o [\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	Účinnost [%]
ČOV A	20,12	23,32	-15,89
ČOV B	22,82	20,24	11,31

Vzorky odpadních vod z ČOV A i ČOV B byly kromě odtoku a přítoku odebrány také z aktivační nádrže, což je znázorněno na Obr. 16. Z hodnot účinnosti odstranění paroxetinu, které jsou uvedeny v Tab. 17, vyplývá, že paroxetin je při čištění vody odstraňován pouze v ČOV B, kdežto v ČOV A je koncentrace na odtoku dokonce větší. To může být způsobeno zatížením zmíněných čistíren a objemem aktivačních nádrží, jak bylo popsáno v kapitole 5.5. V ČOV A, která je na hranici látkového zatížení a která má malý objem aktivační nádrže, může docházet ke zvýšení koncentrace. Naopak ČOV B, která není plně zatížena, vykazuje mnohem lepší účinnost odstranění paroxetinu.

Vzhledem k již zmíněnému faktu, že biodegradace paroxetinu vlivem mikroorganismů je zanedbatelná, nebude docházet při biologickém čištění v aktivačních nádržích k velkému koncentračnímu úbytku. Pokles koncentrace je možné si vysvětlit např. adsorpcí látky na sedimenty v procesu mechanického čištění.

7 ZÁVĚR

Antidepresiva jsou zástupci skupiny psychofarmak, konkrétně se jedná o látky určené k léčbě deprese. Ačkoliv mechanismus jejich účinku není ještě zcela známý, nejčastější teorií popisující jejich působení je jejich vliv na koncentraci některých neurotransmiterů (serotoninu, noradrenalinu, dopaminu) v synaptických oblastech. Z tohoto pohledu, a to i v praxi, jsou nejvhodnější SSRI, které selektivně inhibují zpětné vychytávání serotoninu ze synaptické štěrbinu do presynaptického neuronu. V důsledku této selektivity totiž dochází ke zmírnění jinak často se vyskytujících negativních účinků. Léčiva ze skupiny SSRI jsou proto nejvíce předepisovanými antidepresivy a vzhledem ke stále častějšímu výskytu depresí jejich preskripce v posledních letech vcelku rapidně roste.

Pro stanovení dvou zástupců skupiny SSRI, tj. paroxetinu a citalopramu, v odpadní vodě odebrané ze tří reálných městských ČOV byla zvolena metoda UPLC s detekcí DAD; před samotnou analýzou byla provedena izolace analytů z matrice pomocí SPE. Pro obě látky byly určeny LOD a LOQ použité optimalizované metody, a to s výsledkem LOD v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, LOQ mezi 10 a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Následně byly analyty stanoveny touto optimalizovanou metodou ve vzorcích odpadní vody odebírané z ČOV Brno-Modřice, ČOV A a ČOV B. Koncentrace paroxetinu v analyzovaných vzorcích se v průměru pohybovala kolem 20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, koncentrace citalopramu byla pod LOQ, příp. i pod LOD. Je překvapivé, že odpadní voda obsahovala přibližně o řád větší množství paroxetinu, přestože preskripce citalopramu je ve skutečnosti mnohonásobně větší. Takový výsledek si lze vysvětlit buď matričním efektem, který je v případě odpadní vody nezanedbatelný, případně jiným vnějším faktorem.

Na základě výsledných koncentrací paroxetinu byla u všech ČOV stanovena účinnost jeho odstranění v procesu čištění odpadní vody. Účinnost se pohybovala od 15 do 30 %, kromě ČOV A, kde k odstraňování paroxetinu nedocházelo.

Každopádně je však nutné konstatovat, že vzhledem k LOD a LOQ není použita metoda zcela optimální pro stanovení nízkých koncentrací sledovaných analytů; v optimalizaci by bylo třeba pokračovat v navazujících studiích. Alternativní a často používanou technikou je HPLC s detekcí MS, popř. MS-MS, která má v porovnání s detekcí DAD mnohem větší selektivitu i odezvu. Lze předpokládat, že v případě použití zmíněné metody HPLC/MS-MS by se LOD a LOQ snížily minimálně o dva řády a bylo by možné spolehlivěji kvantifikovat oba analyty.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 1 HAMPL, František a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2002. ISBN 80-708-0495-5.
- 2 Deprese. *Velký lékařský slovník* [online]. Praha: Maxdorf, ©1998–2016 [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/deprese>
- 3 Mánie. *Velký lékařský slovník* [online]. Praha: Maxdorf, ©1998–2016 [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/manie>
- 4 LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
- 5 FUJÁKOVÁ, Michaela a Miloslav KOPEČEK. Antidepresiva – od teorie ke klinické praxi. *Klinická farmakologie a farmacie* [online]. 2012, **26**(1), 29–37.
- 6 Fischer Indole Synthesis. *SynArchive: The Organic Synthesis Database* [online]. Montréal: SynArchive, ©2011–2016 [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: http://www.synarchive.com/named-reactions/Fischer_Indole_Synthesis
- 7 Fichier:Groupe 7-Imipramine (chlorhydrate de).png. *Académie nationale de Pharmacie: Le dictionnaire de l'Académie nationale de Pharmacie* [online]. Strasbourg: Université de Strasbourg, 2016 [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: [http://dictionnaire.acadpharm.org/w/index.php?title=Fichier:Groupe_7-Imipramine_\(chlorhydrate_de\).png&filetimestamp=20141014102101&](http://dictionnaire.acadpharm.org/w/index.php?title=Fichier:Groupe_7-Imipramine_(chlorhydrate_de).png&filetimestamp=20141014102101&)
- 8 Fichier:Groupe 7-Iproniazide (phosphate de).png. *Académie nationale de Pharmacie: Le dictionnaire de l'Académie nationale de Pharmacie* [online]. Strasbourg (France): Université de Strasbourg, 2016 [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: [http://dictionnaire.acadpharm.org/w/index.php?title=Fichier:Groupe_7-Iproniazide_\(phosphate_de\).png&filetimestamp=20141015144103&](http://dictionnaire.acadpharm.org/w/index.php?title=Fichier:Groupe_7-Iproniazide_(phosphate_de).png&filetimestamp=20141015144103&)
- 9 CIRAULO, Domenic A. a Richard I. SHADER. *Pharmacotherapy of depression*. 2nd ed. New York: Humana Press, 2011. ISBN 978-160-3274-340.
- 10 HÖSCHL, Cyril. Neurotrofní účinky antidepresiv. *Farmakoterapie*. 2005, **1**(3), 223–228.
- 11 Fichier:Groupe 7-Noradrénaline.png. *Académie nationale de Pharmacie: Le dictionnaire de l'Académie nationale de Pharmacie* [online]. Strasbourg: Université de Strasbourg, 2016 [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: http://dictionnaire.acadpharm.org/w/index.php?title=Fichier:Groupe_7-Noradrénaline.png&filetimestamp=20141124155921&

- 12 FIŠAR, Zdeněk a Jiří RABOCH. Serotonergní účinky antidepresiv. *Česká a slovenská psychiatrie*. 2011, **107**(2), 115–120.
- 13 Fichier:Groupe 7-Sérotonine.png. *Académie nationale de Pharmacie: Le dictionnaire de l'Académie nationale de Pharmacie* [online]. Strasbourg: Université de Strasbourg, 2016 [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: http://dictionnaire.acadpharm.org/w/index.php?title=Fichier:Groupe_7-Sérotonine.png&filetimestamp=20150328103605&
- 14 Tricyklická antidepresiva (zkr. TCA). *Velký lékařský slovník* [online]. Praha: Mardorf, ©1998–2016 [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <http://lekarske.slovníky.cz/lexikon-pojem/tricyklicka-antidepresiva-zkr-tca-2>
- 15 KERR, G. W. Tricyclic antidepressant overdose: a review. *Emergency Medicine Journal*. **18**(4), 236–241. DOI: 10.1136/emj.18.4.236. ISSN 14720205. Dostupné také z: <http://emj.bmj.com/cgi/doi/10.1136/emj.18.4.236>
- 16 WOOLF, Alan D., Andrew R. ERDMAN, Lewis S. NELSON, et al. Tricyclic antidepressant poisoning: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clinical Toxicology*. 2008, **45**(3), 203–233. DOI: 10.1080/15563650701226192. ISSN 1556 3650. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15563650701226192>
- 17 Související informace: Státní ústav pro kontrolu léčiv. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Praha: SÚKL, ©2010 [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/souvisejici-informace-1>
- 18 Preskripce psychofarmak a jejich ceny v ČR v letech 2003, 2005 a 2008. *Česká a slovenská psychiatrie*. 2010, **106**(2), 119–120. ISSN 1212-0383.
- 19 Fichier:Groupe 7-Paroxétine.png. *Académie nationale de Pharmacie: Le dictionnaire de l'Académie nationale de Pharmacie* [online]. Strasbourg: Université de Strasbourg, 2017 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: http://dictionnaire.acadpharm.org/w/index.php?title=Fichier:Groupe_7-Paroxétine.png&filetimestamp=20150121115825&
- 20 Seroxat 20 Mg. *Příbalový Leták* [online]. Klatovy: Analogic, ©2017 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <https://pribalovy-letak.info/seroxat-20-mg/souhrn>
- 21 Paroxetine. *DrugBank* [online]. Edmonton (Kanada): University of Alberta, 2006 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00215>
- 22 Fichier:Groupe 1bis-Citalopram (chlorhydrate et bromhydrate de).png. *Académie nationale de Pharmacie: Le dictionnaire de l'Académie nationale de Pharmacie* [online]. Strasbourg: Université de Strasbourg, 2016 [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: [http://dictionnaire.acadpharm.org/w/index.php?title=Fichier:Groupe_1bis-Citalopram_\(chlorhydrate_et_bromhydrate_de\).png&filetimestamp=20140603135329&](http://dictionnaire.acadpharm.org/w/index.php?title=Fichier:Groupe_1bis-Citalopram_(chlorhydrate_et_bromhydrate_de).png&filetimestamp=20140603135329&)

- 23 Citalec 20 Zentiva. *Příbalový Leták* [online]. Klatovy: Analogic, ©2017 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <https://pribalovy-letak.info/citalec-20-zentiva/souhrn>
- 24 Citalopram. *DrugBank* [online]. Edmonton (Kanada): University of Alberta, 2016 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00215>
- 25 UŘINOVSKÁ, R., M. TURJAP, H. BROZMANOVÁ a M. GRUNDMANN. Analytické metody pro stanovení vybraných psychofarmak. *Česká a slovenská farmacie*. 2010, **59**(3), 103–111.
- 26 UŘINOVSKÁ, R., H. BROZMANOVÁ a I. KACÍŘOVÁ. Stanovení psychofarmak pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. *FONS*. 2014, **24**(3), 8–11.
- 27 VAN NUIJS, Alexander L. N., Isabela TARCOMNICU, Ward SIMONS, Lieven BERVOETS, Ronny BLUST, Philippe G. JORENS, Hugo NEELS a Adrian COVACI. Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of 13 top-prescribed pharmaceuticals in influent wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, **398**(5), 2211–2222. DOI: 10.1007/s00216-010-4101-1. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-4101-1>
- 28 YUAN, Sheng-Liu, Xiao-Feng LI, Xiao-Man JIANG, Hai-Xia ZHANG a Shao-Kui ZHENG. Simultaneous Determination of 13 Psychiatric Pharmaceuticals in Sewage by Automated Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2013, **41**(1), 49–56. DOI: 10.1016/S1872-2040(13)60623-4. ISSN 18722040. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872204013606234>
- 29 UNCETA, Nora, Alberto GÓMEZ-CABALLERO, Alicia SÁNCHEZ, Silvia MILLÁN, M. Carmen SAMPEDRO, M. Aránzazu GOICOLEA, Joan SALLÉS a Ramón J. BARRIO. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine and their main metabolites in human urine samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, **46**(4), 763–770. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.11.048. ISSN 07317085. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708507007327>
- 30 LUCCA, Adelio, Gianluca GENTILINI, Saul LOPEZ-SILVA a Armando SOLDARINI. Simultaneous Determination of Human Plasma Levels of Four Selective Serotonin Reuptake Inhibitors by High-Performance Liquid Chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2000, **22**(3), 271–276. DOI: 10.1097/00007691-200006000-00007. ISSN 0163-4356. Dostupné také z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>
- 31 LOGARINHO, F., T. ROSADO, C. LOURENÇO, M. BARROSO, A. R. T. S. ARAUJO a E. GALLARDO. Determination of antipsychotic drugs in hospital and wastewater treatment plant samples by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2016, **1038**, 127–135. DOI:

- 10.1016/j.jchromb.2016.10.031. ISSN 15700232. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023216311126>
- 32 HIMMELSBACH, Markus, Wolfgang BUCHBERGER a Christian W. KLAMPFL. Determination of antidepressants in surface and waste water samples by capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection after preconcentration using off-line solid-phase extraction. *ELECTROPHORESIS*. 2006, **27**(5–6), 1220–1226. DOI: 10.1002/elps.200500693. ISSN 0173-0835. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.200500693>
- 33 HORÁKOVÁ, Marta. *Analytika vody*. Vyd. 2., opr. a rozš. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2003. ISBN 80-708-0520-X.
- 34 KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- 35 LUCCI, Paolo, Deborah PACETTI, Oscar NUNEZ a Natale G. Current. Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. *Chromatography – The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. InTech, 2012. DOI: 10.5772/47736. ISBN 978-953-51-0813-9. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/current-trends-in-sample-treatment-techniques-for-environmental-and-food-analysis>
- 36 PRAUS, Petr a Jiřina VONTOROVÁ. *Analytická chemie II*. Ostrava: VŠB – Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5.
- 37 ESI mass spectrometry—why we use it for oligonucleotide quality control. *Integrated DNA Technologies* [online]. Coralville (Iowa): Integrated DNA Technologies, 2017 [cit. 2017-05-02]. Dostupné z: <http://www.idtdna.com/pages/decoded/decoded-articles/core-concepts/decoded/2017/01/31/esi-mass-spectrometry-why-we-use-it-for-oligonucleotide-quality-control>
- 38 Final Report: The Environmental Occurrence, Fate, and Ecotoxicity of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) in Aquatic Environments. *United States Environmental Protection Agency* [online]. Washington: US EPA, 2008 [cit. 2017-05-14]. Dostupné z: https://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.highlight/abstract/1755/report/F
- 39 IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. *The Gold Book* [online]. Oxford. ©2014 [cit. 2014-05-12]. Dostupné z: <http://goldbook.iupac.org/>.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

5-HT	Serotonin (5-hydroxytryptamin); serotoninergní receptory
CIT	Citalopram
ČSN	Česká technická norma
ČOV	Čistírna odpadních vod
DA	Dopamin
DAD	Detektor s diodovým polem (spektrofotometrický)
DDD	Definovaná denní dávka
DOPA	Dioxyfenylalanin
ECD	Detektor elektronového zachytu
ESI	Ionizace elektrosprejem
FID	Plamenový ionizační detektor
GC	Plynová chromatografie
HILIC	Kapalinová chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IMAO	Inhibitory monoaminoxidas
IT	Iontová past
LC	Kapalinová chromatografie
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MAO	Monoaminoxidasa
MAO-A	Monoaminoxidasa typu A
MAO-B	Monoaminoxidasa typu B
MS	Hmotnostní detektor
NA	Noradrenalin
NATT	Noradrenalinový transportér
NP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi
PAR	Paroxetin
PC	Papírová chromatografie
PDA	Detektor s diodovým polem (spektrofotometrický)
PID	Fotoionizační detektor
QT	QT interval v elektrokardiogramu (doba trvání depolarizace a repolarizace komorové svaloviny)
R	<i>Reuptake</i> (zpětné vychytávání)
RIMA	Reverzibilní inhibitory monoaminoxidas typu A
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
SARI	Antidepresiva se zdvojeným serotoninovým působením
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SPE	Extrakce na tuhou fázi
SPME	Mikroextrakce na tuhou fázi

SSRI	Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TCA	Tricyklická antidepresiva
TCD	Tepelně vodivostní detektor
TDM	Terapeutické monitorování léčiv
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
TYR	Tyrosin
UPLC	Ultraúčinná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné záření (světlo)

10 SEZNAM PŘÍLOH

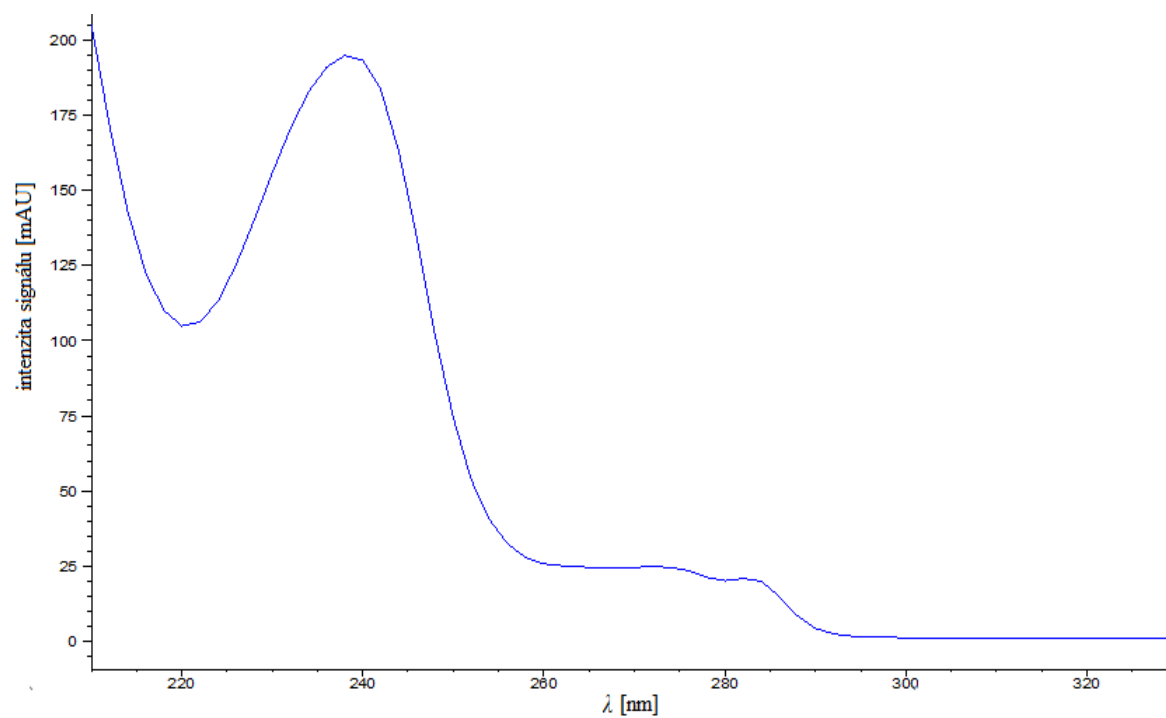
Příloha 1: Absorpční spektra analytů

Příloha 2: Chromatogramy standardů

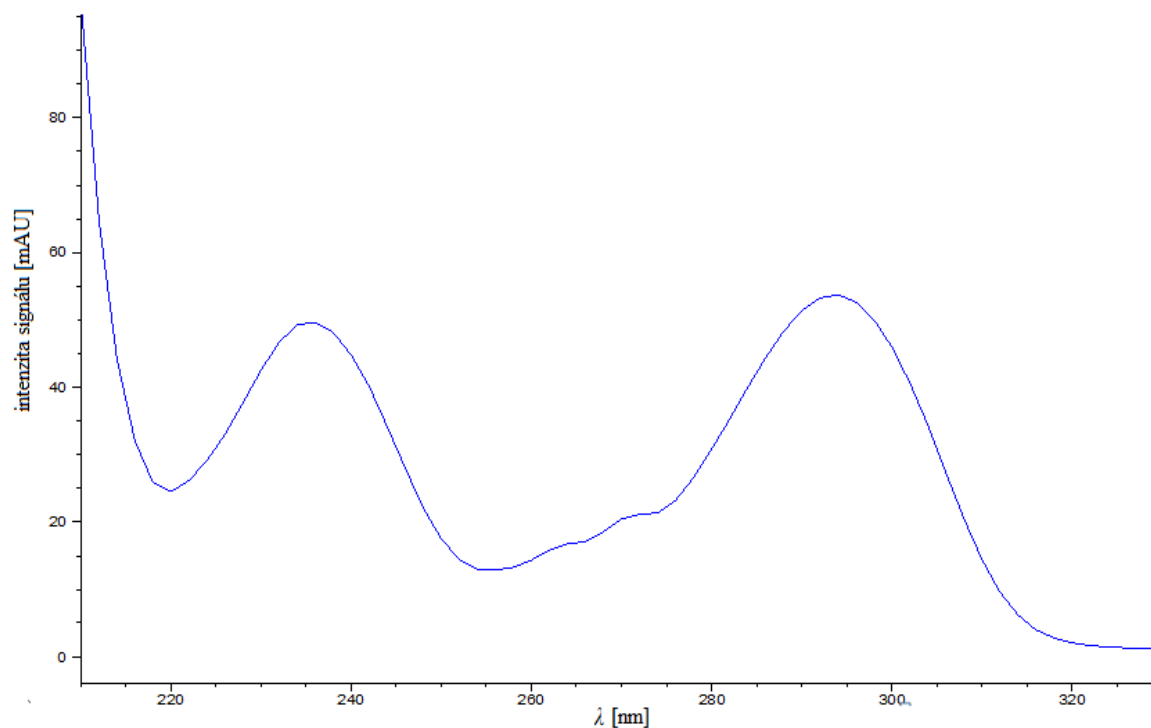
Příloha 3: Chromatogramy reálných vzorků

11 PŘÍLOHY

Příloha 1: Absorpční spektra analytů

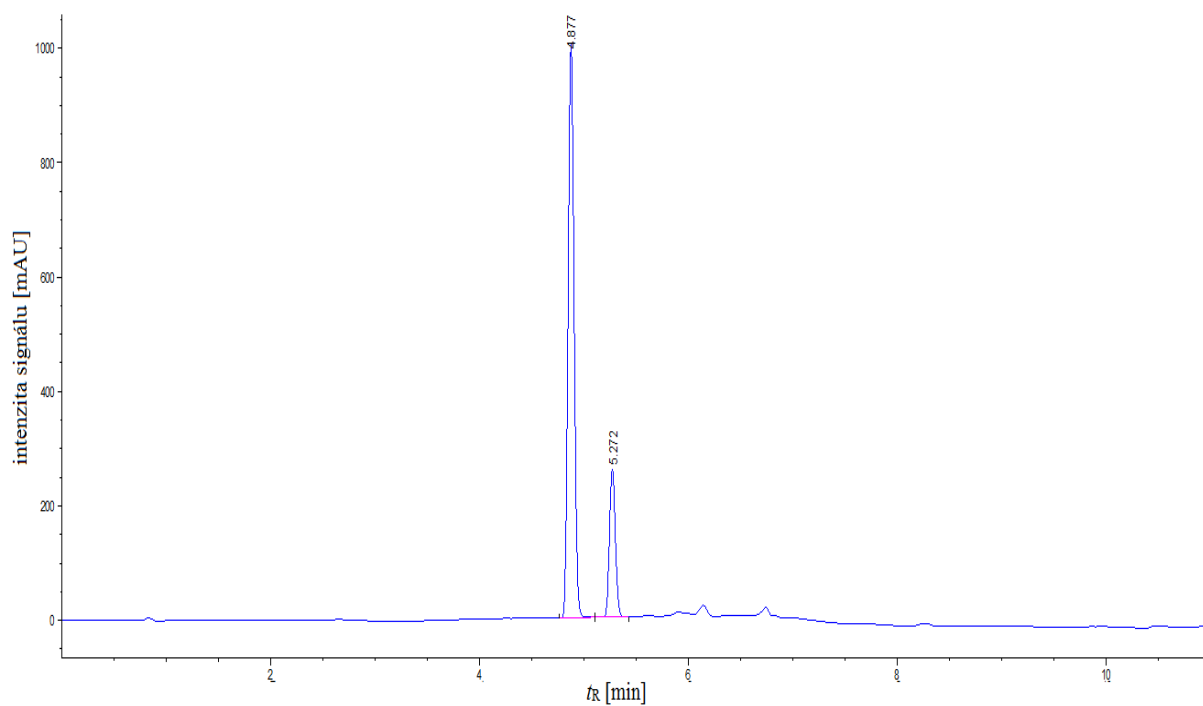


Obr. 17: Absorpční spektrum citalopramu

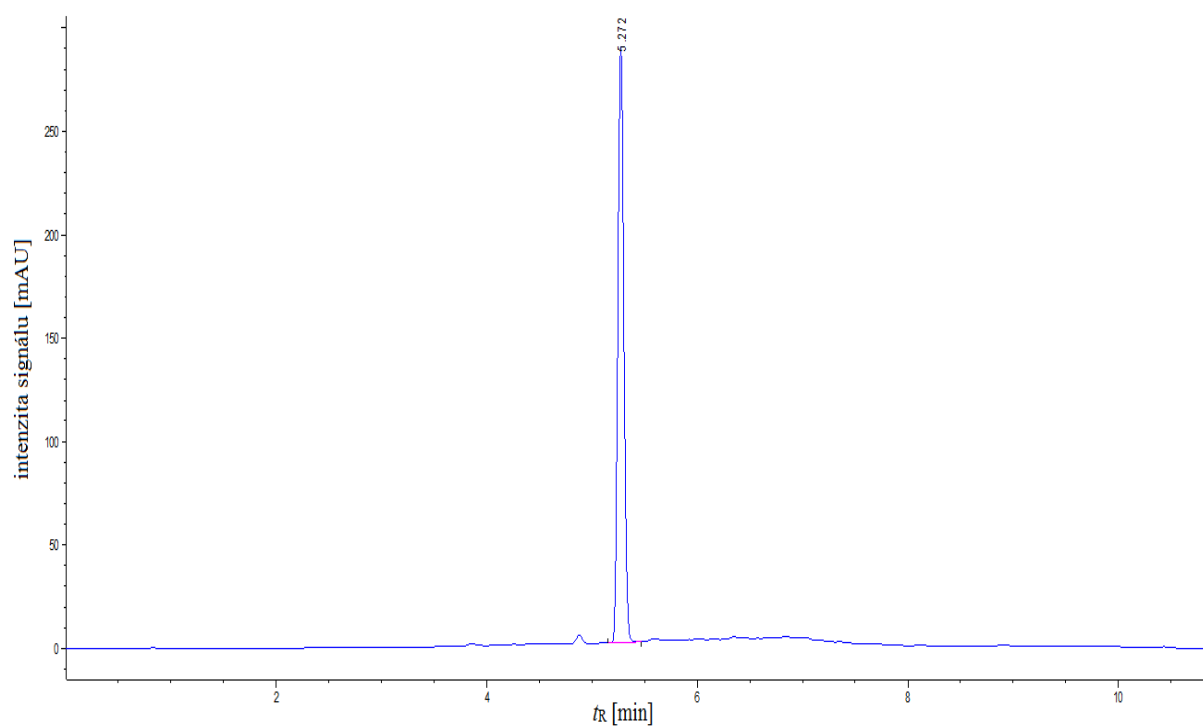


Obr. 18: Absorpční spektrum paroxetinu

Příloha 2: Chromatogramy standardů

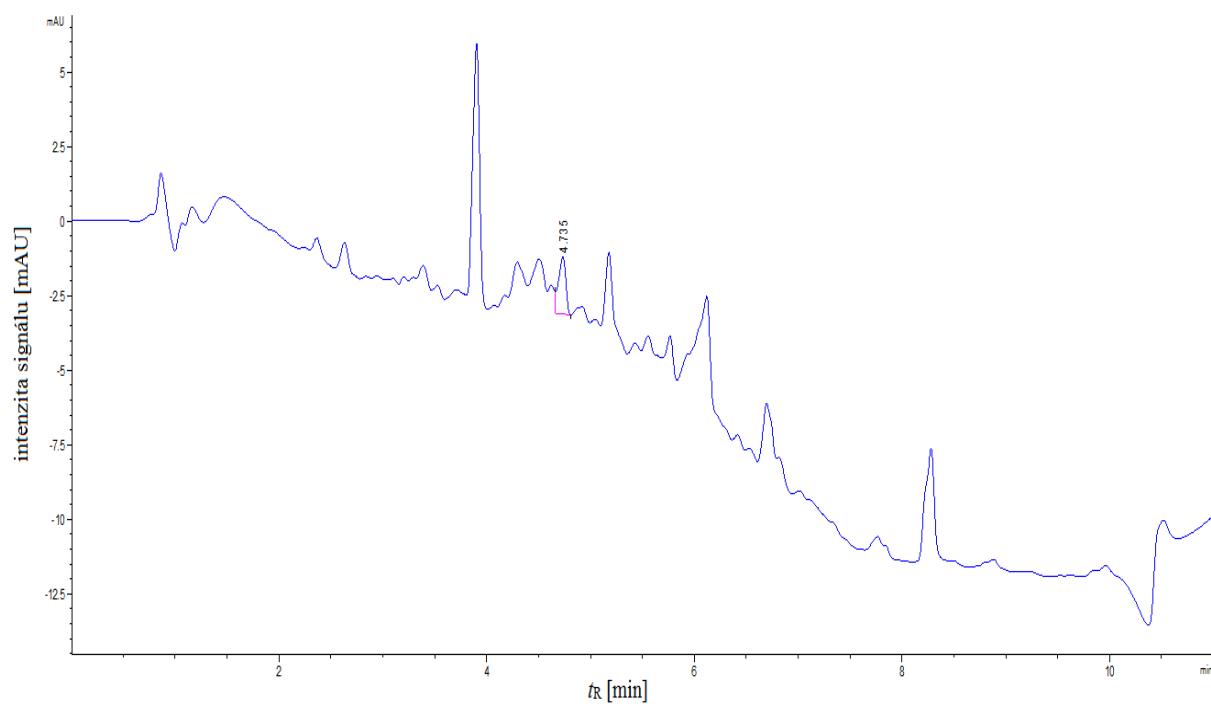


Obr. 19: Chromatogram standardů, detekce při 238 nm

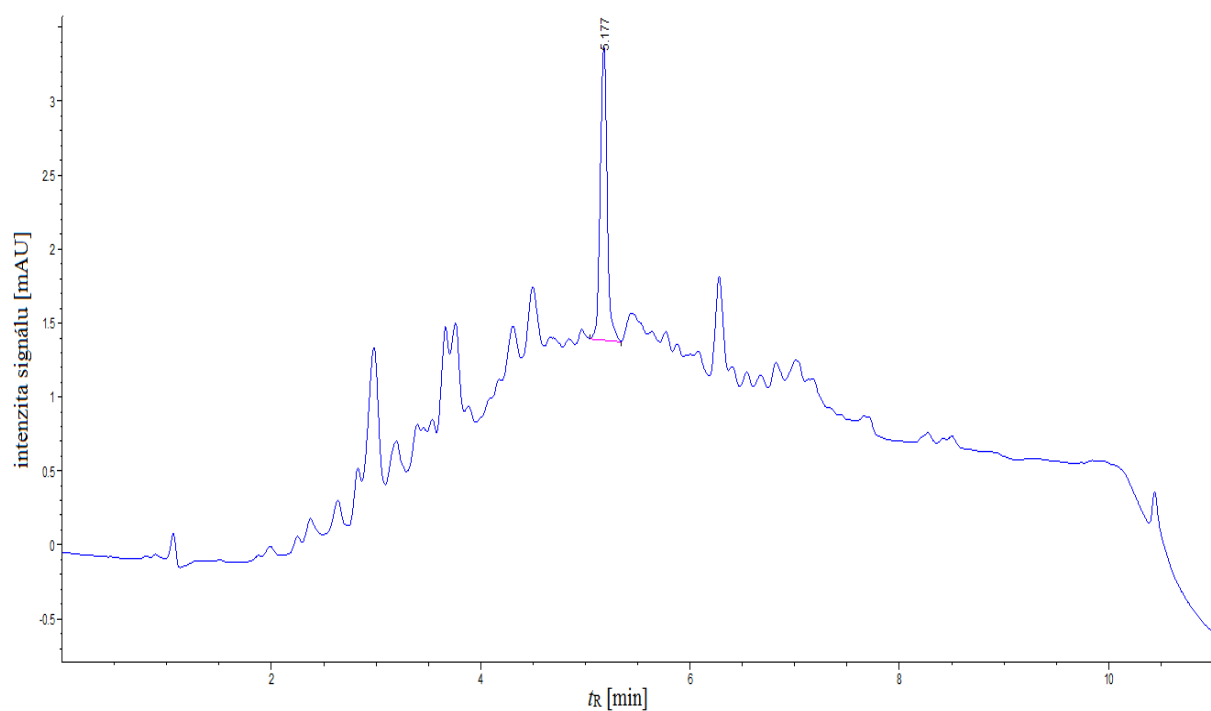


Obr. 20: Chromatogram standardů, detekce při 293 nm

Příloha 3: Chromatogramy reálných vzorků



Obr. 21: Chromatogram vzorku ČOV A, aktivací nádrž, detekce při 238 nm



Obr. 22: Chromatogram vzorku ČOV A, odtok, detekce při 293 nm